

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

DIPLOMOVÁ PRÁCE

HPLC hodnocení vybraných léčiv VIII
HPLC evaluation of selected pharmaceuticals VIII



Hradec Králové 2014

Martina Hynková

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla použita k získání stejného nebo jiného titulu.

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucímu své diplomové práce RNDr. Milanovi Mokrému, Csc. za jeho odborné vedení, všestrannou pomoc, trpělivost a cenné rady jak při práci v laboratoři, tak během zpracovávání výsledků a psaní závěrečné práce.

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

Studentka: **Martina Hynková**

Školitel: RNDr. Milan Mokřý, CSc.

Diplomová práce:

HPLC hodnocení vybraných léčiv VIII.

Byla vypracována metoda RP-HPLC pro současnou analýzu paracetamolu, kyseliny askorbové a fenylefrinu v léčivém přípravku (prášek pro přípravu perorálního roztoku), ve kterém je množství paracetamolu 60x větší než množství fenylefrinu. Jako stacionární fáze byla použita kolona Macherey-Nagel s náplní NUCLEOSIL C18. Délka kolony 150 mm; 4 mm id; velikost zrn 5 μm . Izokratická eluce mobilní fází složenou z 0,001M tlumivého roztoku dihydrogenfosforečnanu draselného a organického rozpouštědla methanolu (80 : 20, V/V; upravena na pH 3,00 přidavkem 50% H_3PO_4), probíhala při průtoku 0,7 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ a teplotě 25 °C do 14 min. Nástřik 10 μl . Detekce UV při vlnové délce 225 nm. Byl hodnocen vliv změn ve složení mobilní fáze (pH, množství organického modifikátoru a koncentrace pufru). Byly vypracovány kalibrační závislosti použitelné pro stanovení obsahu LP. Jako vnitřní standard byl použit allopurinol.

Abstract

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control

Student: **Martina Hynková**

Supervisor: RNDr. Milan Mokrý, CSc.

Diploma thesis:

HPLC evaluation of selected pharmaceuticals VIII

RP-HPLC method for simultaneous analysis of Paracetamol, Ascorbic Acid and Phenylephrine in pharmaceutical formulation (powder for oral solution) was developed. In this formulation, the amount of Paracetamol is sixtimes higher then the amount of Phenylephrine. Macherey-Nagel column NUCLEOSIL C18 (150 mm x 4 mm id, 5 μ m particle size) was used as a sorbent. Isocratic elution with mobile phase composed of 0,001M monopotassium phosphate puffer and organic modifier methanol (80 : 20, V/V; pH 3,00 – adjusted with 50% phosphoric acid) at a flow rate of 0,7 ml.min⁻¹ and 25 °C in less then 14 minutes. UV detection at the wavelenght 225 nm. Sample volume 10 μ l. The influence of variations in mobile phase parameters (pH, content of organic modifier and puffer concentration) was observed. With allopurinol as an IS, calibration was performed to enable quantification of drugs in pharmaceutical formulation.

Obsah

1 ÚVOD	7
2 Teoretická část	8
2.1 Chromatografie	8
2.1.1 Princip	8
2.1.2 Klasifikace chromatografických systémů	8
2.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	16
2.2.1 Význam a využití	16
2.2.2 Přístrojové uspořádání	17
2.2.2.1 Obecné schéma a základní součásti systému	17
2.2.2.2 Stacionární fáze pro HPLC systémy	22
2.2.2.3 Detektory v HPLC	25
2.2.3 Vyhodnocení analýzy	29
2.2.3.1 Základní charakteristiky	30
2.2.3.2 Kvalitativní analýza	31
2.2.3.3 Kvantitativní analýza	31
2.3 Vlastnosti analyzovaných látek	33
2.3.1 Paracetamol	33
2.3.2 Fenylefrin a fenylefrin-hydrochlorid	37
2.3.3 Kyselina askorbová	41
2.4 Analýza v odborné literatuře	45
3 CÍL PRÁCE	51
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	52
4.1 Pomůcky, přístroje, materiál, chemikálie	52
4.2 Pracovní postup	54
4.2.1 Výběr fází, vlnové délky a podmínek separace	54
4.2.2 Výběr vnitřního standardu	55
4.2.3 Příprava MP, zásobních roztoků a roztoků vzorků	56
4.2.4 Změny parametrů MP a jejich vliv na analýzu	58
4.2.5 Kalibrace	59
5 VÝSLEDKY A DISKUZE	61
5.1 Chromatografické podmínky	61
5.2 Podmínky pro stanovení obsahu	65
6 ZÁVĚR	68
7 SEZNAM ZKRATEK	69
8 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	72

1 ÚVOD

Se stoupajícími požadavky na citlivost, přesnost, selektivitu a rychlost v analytické chemii dochází k progresivnímu vývoji instrumentálních metod. Široce používány jsou chromatografické separační metody, z nichž je v analytických laboratořích všech zaměření (včetně analýzy léčiv) nejrozšířenější vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). Vyniká vysokou účinností separace analyzované směsi, k níž dochází na základě rozdílných interakcí jednotlivých složek se stacionární a mobilní fází. Mobilní fáze je zde přiváděna do systému za vysokého tlaku. Metoda umožňuje zároveň kvalitativní i kvantitativní analýzu separovaných složek.

Paracetamol a fenylefrin se používají v léčivých přípravcích indikovaných pro tlumení symptomů akutních infekcí horních cest dýchacích. Paracetamol snižuje horečku a působí úlevu při bolesti v krku, bolestech hlavy, svalů a kloubů. Fenylefrin usnadňuje dýchání uvolněním ucpaného nosu i vedlejších nosních dutin, pomáhá také u onemocnění očí spojených s překrvením spojivek. Systémové podání fenylefrinu bývá často účinnější, aplikace je snazší než u lokálních lékových forem, navíc použití kombinovaného léčivého přípravku zlepší compliance pacienta. Pro člověka esenciální kyselina askorbová neboli vitamín C je do kombinace přidávána pro doplnění jejího nedostatku v období nástupu infekce (při prvních projevech nachlazení a chřipky). (1) (2)

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 CHROMATOGRAFIE

2.1.1 Princip

Obecně je chromatografie jev diferenciální migrace látek mezi dvěma nemísitelnými fázemi systému (stacionární a mobilní). Z molekulárně kinetického hlediska je chápána jako výsledek kontinuálního procesu, při kterém dochází k narušování a obnovování rovnováhy mezi koncentracemi látky ve fázích chromatografického systému. Rovnováha je porušována konvekcí mobilní fáze a ustavována difúzí částic látky. (3)

Z praktického hlediska představuje chromatografie separační metodu instrumentální analýzy, která umožňuje oddělení složek obsažených ve vzorku a jejich kvalitativní a kvantitativní analýzu. Vzorek se vnáší mezi fáze systému a je unášen fází mobilní. Ustavuje se zde dynamická rovnováha mezi reverzibilní sorpcí a desorpcí, částice látek se neustále pohybují mezi oběma fázemi. K separaci složek směsi dochází vlivem jejich rozdílné afinity ke stacionární fázi a mobilní fázi, která má za následek rozdílnou retenci látek při pohybu chromatografickým systémem. Složky s větší afinitou k nepohyblivé fázi se zde při pohybu déle zdržují, jsou zpomaleji vymývány (eluovány) mobilní fází. (4) (5)

2.1.2 Klasifikace chromatografických systémů

Dnes existuje mnoho typů chromatografie, lišit se mohou

- A. skupenstvím fází,
- B. fyzickým uspořádáním,
- C. podstatou separačního děje,
- D. způsobem vyvíjení. (5)

A. Rozdělení chromatografie dle skupenského stavu fází

Mobilní fáze může mít charakter kapaliny nebo inertního plynu, její skupenství je základním kritériem pro rozdělení chromatografických metod na chromatografii kapalinovou a plynovou (LC a GC). Kombinací obou principů je superkritická fluidní chromatografie (SFC), používající jako mobilní fázi tekutinu v nadkritickém stavu. (6)

Stacionární fáze může být tuhá látka, tzv. sorbent - adsorpční chromatografie (LSC a GSC) nebo kapalina, která bývá obvykle zakotvena na pevném nosiči - rozdělovací chromatografie (LLC a GLC).

B. Rozdělení chromatografie dle uspořádání v prostoru

Podle uspořádání systému v prostoru rozlišujeme techniky planární (plošné) a kolonové (sloupcové).

Starší a dnes již překonanou plošnou technikou je papírová chromatografie (PC), při níž separace probíhá na ploše chromatografického papíru, jenž přímo obsahuje stacionární fázi – vodu. Prakticky se používá tenkovrstvá chromatografie (TLC), kdy je stacionární fáze zakotvena na plochém inertním nosiči. U obou těchto technik probíhá vyvíjení chromatogramu v nádobě s mobilní fází (směs rozpouštědel) buď jejím vztlínáním (vzestupně) nebo přetékáním (sestupně). Při sestupném uspořádání se nabízí možnost vylepšení separace, po ukončení vyvíjení jedním směrem lze chromatogram otočit a v kolmém směru s jinou mobilní fází vyvíjet znovu (dvourozměrná chromatografie). Chromatografované látky se většinou detekují přímo v systému, neopouští po separaci chromatografickou desku. Detekce probíhá vizuálně, buď po postřiku činidly a vzniku barevných skvrn, anebo pomocí UV záření při použití sorbentu s obsahem fluorescenčního indikátoru. Základní charakteristikou pro identifikaci látek je retenční faktor (poměr vzdáleností středu skvrny od startu a čela mobilní fáze od startu).

U kolonové chromatografie (např.: HPLC, GC) je stacionární fáze umístěna v trubici a to buď na vhodném nosiči, kterým je kolona vyplněna, nebo může být zakotvena přímo na její vnitřní stěně (kapilární kolony v plynové chromatografii). Analýza látek neprobíhá v místě separace, eluát putuje z kolony do detekčního zařízení. (3) (4) (7)

C. Rozdělení chromatografie dle mechanismu separace

Podstata separačního děje je dalším klasifikačním kritériem chromatografických metod. Dle povahy interakcí částic s fázemi lze chromatografii rozčlenit na adsorpční, rozdělovací, iontově výměnnou, gelovou a afinitní.

ADSORPČNÍ CHROMATOGRAFIE

Principem zadržování látek je jejich adsorpce z kapalné (LSC) nebo plynné (GSC) mobilní fáze na povrch pevné stacionární fáze - adsorbentu. Je důsledkem různých silných interakcí povrchu sorbentu s analyzovanou látkou a povrchu sorbentu s mobilní fází. Míra retence látek směsi a jejich eluční pořadí jsou výrazně ovlivněny jak povahou sorbentu, tak vlastnostmi použité mobilní fáze. Pro výběr mobilní fáze slouží eluotropická řada rozpouštědel (řazení rozpouštědel podle rostoucí polarity).

Nejpoužívanější technikou je pro své mnohé výhody kapalinová adsorpční chromatografie, u níž je za účelem zvýšení účinnosti a rychlosti separace mobilní fáze přiváděna na kolonu za vysokého tlaku (HPLC). Podle relativní polarity fází lze rozlišit základní separační módy HPLC – chromatografii na normálních a obrácených fázích (NP a RP). NP-HPLC je nejstarším separačním módem a v analýze léčiv se dnes již téměř nevyužívá. Naopak systémy s RP se kontinuálně rozvíjí. (8)

V systémech s normálními fázemi (NP-HPLC) je adsorbent polární (nemodifikovaný silikagel nebo vázané fáze kyano, amino, hydroxyl, nitro, polyethylenglykol) a mobilní fáze nevodná směs rozpouštědel. Eluce probíhá v pořadí podle rostoucí polarity funkčních skupin látek, polárnější složky vzorku jsou více zadržovány na koloně. Zvýší-li se polarita mobilní fáze, například obsahem většího množství vody, aktivita sorbentu je snížena množstvím naadsorbované vody. Obsah vody v rozpouštědle je proto při separaci na NP důležitým faktorem a je nutné ho kontrolovat. Vhodné je chránit systém také před vzdušnou vlhkostí. NP-HPLC umožňuje separovat polární látky, látky snadno hydrolyzovatelné nebo s vysoce hydrofobními vlastnostmi. Polární interakce (elektrostatické nebo vodíkové vazby) jsou kvůli svému krátkému dosahu také ovlivnitelné sterickými efekty, zastínění polárních skupin v molekule způsobí

pokles retence. Rozdílu v interakcích polohových izomerů s adsorbentem (*cis* je zadržován více než *trans*) lze využít pro jejich separaci. (9) (10)

Častěji využívané jsou systémy s reverzními fázemi (RP-HPLC). Méně polární je zde adsorbent (C18 oktadecylsilyl, C8 oktylsilyl, fenyl, amidové nebo alkyl/aryl fluorované fáze, ale také kyano a amino) a elučním činidlem je polární rozpouštědlo. Při vhodné úpravě sorbentu a složení mobilní lze na RP separovat látky nepolární i polární. Obrácení fází je výhodnější pro praktické použití, není zde nutné pracovat s těkavými nevodnými organickými rozpouštědly.

(9) (10) (11)

Další modifikace fází vedly k rozvoji mnoha dalších separačních módů. Příkladem může být hydrofobní interakční chromatografie (HIC), která využívá schopnosti proteinů a velkých peptidů adsorbovat se na hydrofobní povrchy. K jejich separaci se používají vodné mobilní fáze bez přídavku organického rozpouštědla (nedochází k denaturaci proteinů). Převážně hydrofilní stacionární fáze s malou částí povrchu s hydrofobními vlastnostmi je smáčena mobilní fází s rozpuštěnými proteiny. Retence je zahájena mobilní fází s vysokou koncentrací solí. Snížení množství volné vody v mobilní fázi přídavkem soli způsobí vysrážení proteinů a zároveň se pro ně odkrývají hydrofobní centra povrchu stacionární fáze. Hydrofobní interakce proteinů s povrchem se následně poruší snížením iontové síly mobilní fáze, gradientová eluce je tedy vyvolána snižováním koncentrace solí. (12)

Naopak příkladem alternativy k NP-HPLC je chromatografie hydrofilních interakcí (HILIC), která slouží k dělení polárních nebo ionogenních látek (AMK, peptidů, sacharidů aj.). Při této metodě se do převážně organické mobilní fáze přidává vodná složka s větší eluční silou, která přilne k polární stacionární fázi a vytvoří tak na jejím povrchu vodnou vrstvu. Mechanismem separace je rozdělování společně s elektrostatickými interakcemi. Retence stoupá s polaritou analytu nebo stacionární fáze. Eluce je provedena zvýšením obsahu vody v mobilní fázi (tzn. zvýšením polarity mobilní fáze). (13) (14)

ROZDĚLOVACÍ CHROMATOGRAFIE

Mechanismem distribuce částic analytu ve fázi u rozdělovací chromatografie je fyzikální rozpouštění látek. Stacionární fází je vždy kapalina zakotvená na inertním nosiči. Dle použité mobilní fáze se rozlišuje LLC, kde separace využívá rozdělování látek mezi stacionární a mobilní fází na základě jejich rozdílné rozpustnosti ve dvou nemísitelných kapalinách (tzv. rozdělovací rovnováha), nebo GLC, kde je separace založena na rozdílné rozpustnosti složek, které jsou unášeny nosným plynem, v kapalně stacionární fázi.

Podmínkou v LLC je vzájemná nemísitelnost kapalných fází, vymývání stacionární fáze se zabraňuje použitím chemické vazby kapaliny na nosič. Chemickou modifikací se připravují stacionární fáze s navázanými funkčními skupinami, podle nichž získají fáze různě vysokou polaritu nebo mohou být nepolární (RP). (4) (7)

IONTOVĚ-VÝMĚNNÁ CHROMATOGRAFIE (IEC)

Tato technika je vhodná pouze pro dělení elektrolytů v iontové formě, použita je vždy vodná mobilní fáze. Využívá se zde různě velkých přitažlivých elektrostatických sil mezi ionty vzorku a funkčními skupinami pevné stacionární fáze opačného náboje.

Jako stacionární fáze se používají iontoměniče – ionexy (ion exchangers) – makromolekulární matrice s pevně navázanými funkčními skupinami, na které jsou iontovou vazbou připojeny ionty s opačným nábojem. Ionty vzorku se pohybují difúzí kapalinou k iontoměniči a vytěsní vyměnitelné ionty vázané na jeho funkčních skupinách.

Při separaci silných kyselin a bází se používají iontoměniče slabé (WAX, WCX) s navázanými skupinami, které získají náboj potřebný pro vytvoření iontového páru až při příslušné změně prostředí (sekundární aminy, karboxylové kyseliny). Pro analýzu slabých kyselin a zásad se volí silné (SAX, SCX) iontoměniče, nesoucí stále nabitě funkční skupiny (kvartérní amin, sulfonová kyselina). K retenci dochází po ionizaci analytu.

Kyselé látky se analyzují na aneksu, což je typ iontoměniče, který obsahuje pozitivně nabitě funkční skupiny nebo funkční skupiny bazické, jež po ionizaci získají kladný náboj. Je tedy schopen vázat anionty, tudíž kyseliny po ionizaci. Ta

je umožněna správnou volbou podmínek separace - pH mobilní fáze, tj. alespoň o jednotku vyšší než je pK_a analytu.

Katex obsahuje naopak negativně nabitě skupiny nebo skupiny kyselé, které v bazickém prostředí získají záporný náboj. Má tedy schopnost vázat a vyměňovat kationty a slouží k separaci látek bazických (pH mobilní fáze minimálně o jednotku nižší než pK_a analytu).

Obvykle gradientovou eluci provádíme změnou eluční síly mobilní fáze, která je v IEC určena jejím pH a iontovou silou. Při změně pH mobilní fáze dochází k porušení iontových interakcí neutralizací slabšího iontu z vazebného páru. Gradientu pH se využívá také při dělení amfoterních iontů (např.: AMK, peptidy). Měníme-li iontovou sílu mobilní fáze, analyt je z vazby na stacionární fázi vytěsňován ionty se silnější interakcí. (6)

GELOVÁ PERMEAČNÍ CHROMATOGRAFIE (GPC)

Bývá také nazývána jako molekulová vylučovací chromatografie (SEC) nebo filtrace molekulovým sítím. Je to zvláštní typ rozdělovací LLC, stacionární fází je gel s póry do určité velikosti. Složky unášené proudem mobilní fáze se separují na základě velikosti molekul, eluují se z kolony v pořadí podle klesající molekulové hmotnosti. Menší částice pronikají do pórů gelu více, a proto se na koloně více zdrží. Mobilní fáze na eluční pořadí vliv nemá, ovlivnit však může velikost pórů (stupeň bobtnání) organických gelů a tím také rychlost eluce. Mobilní fáze se volí podobně jako gel podle vlastností separovaných látek, pro látky ve vodě rozpustné voda, někdy s přídavkem organického rozpouštědla, pro látky nerozpustné ve vodě pak například aromatické uhlovodíky.

Pro účinnou separaci je důležitá volba stacionární fáze s vhodnou distribucí velikosti pórů a polaritou. Pro separaci látek rozpustných ve vodě se vybírá z gelů hydrofilních (dextranové, polyakrylamidové, hydroxyalkylmethakrylátové a agarózové gely), pro analýzu látek ve vodě nerozpustných se naopak hodí hydrofobní gely (polystyrenový nebo polyvinylacetátový gel). Univerzální použití z hlediska rozpustnosti analyzovaných látek ve vodě mají nebobtnající aerogely (pórovité silikagely nebo skla).

Detekci je možné provést diskontinuálně vhodnou analytickou metodou stanovením obsahu látek v jednotlivých frakcích eluátu či kontinuálně zapojením nedestruktivního detektoru za kolonu, kde usnadní sběr frakcí.

GPC má široké využití, aplikovat ji lze pro oddělení látek nízkomolekulárních a vysokomolekulárních (odsolování), frakcionaci látek podle molekulové hmotnosti v biochemických (enzymy, AMK, viry, hormony aj.) i organických (oligomery, polymery) laboratořích nebo pro stanovení relativní molekulové hmotnosti pomocí vypracování kalibrační závislosti. (4) (6)

AFINITNÍ CHROMATOGRRAFIE

Je to specifický typ adsorpční LSC s vysokou selektivitou, nalézá využití hlavně v biochemických analýzách při izolaci biopolymerů nebo zkoumání povahy jejich vazeb na ligandy. Je založena na specifické nevazebné interakci biopolymeru s ligandem (afinant) kovalentně vázaným na povrchu vhodného nosiče. Stacionární fáze s navázaným ligandem není vždy komerčně dostupná a v některých případech se tedy musí připravit laboratorně (vhodný nosič se po chemické aktivaci prolíje roztokem ligandu, který se zde kovalentně naváže). Po důkladném promytí se provádí vlastní separace. Specificky vázaná složka se pak nakonec (po vymytí všech slabě nespecificky vázaných) z kolony odstraní vhodným elučním činidlem, nejčastěji pufrům o vysokém či nízkém pH. Změnou konformace či náboje v kyselém či zásaditém prostředí se naruší nevazebná interakce a izolovaná složka se eluuje z kolony. Méně častá je eluce využívající mobilní fáze v podobě vytěšňovacího činidla s vyšší afinitou k ligandu než má navázaná složka. (11) (15)

D. Rozdělení chromatografie podle způsobu vyvíjení

Rozlišujeme chromatografii frontální, eluční a vytěšňovací.

Při frontálním uspořádání se sorbent nejprve promývá mobilní fází se směsí látek určených k separaci. Postupnou sorpcí složek dojde k saturaci chromatografického systému, ten se pak promývá čistou mobilní fází a dochází k postupné eluci látek. Při desorpci se spolu s čistou mobilní fází nejprve eluuje směs všech složek, poté postupně směsi ochuzené vždy o nejméně sorbovanou složku a nakonec se vymývá složka s největší schopností sorpce. Výstupem je frontální chromatogram

s fází sorpční a desorpční, používá se spíše v plynové chromatografii pro výzkum sorpčních procesů. (3) (4)

Praktickou aplikací této techniky je snad jen příprava demineralizované (deionizované) vody na iontoměničích, kdy se využívá fáze sorpční. Mobilní fází je zde samotná voda a vyměňují se ionty v ní rozpuštěných solí za vodíkové a hydroxidové ionty až do vyčerpání kapacity stacionární fáze. Poté se ionexy musí chemicky regenerovat (pomocí HCl a NaOH). (16)

U eluční chromatografie se analyt dávkuje jednorázově u vstupu mobilní fáze na chromatografické lože a promývá se proudem čisté mobilní fáze. Při vyvíjení úzké zóny složek vzorku diferenciálně migrují. Složky jsou nakonec postupně eluovány, nejdříve ta, která se ve stacionární fázi nejméně zdržuje. Tento způsob je nejjednodušší, účinný a dnes také nejvíce používaný. Pro vymývání vzorku z kolony se zde nabízí tři různé varianty:

- 1) Při promývání kolony kapalinou o stále stejném složení (čisté rozpouštědlo nebo směs rozpouštědel) mluvíme o jednoduché *izokratické* eluci. Použít ji lze při separaci látek, jež jsou na základě svých fyzikálně-chemických vlastností podobně distribuovány mezi stacionární a mobilní fází.
- 2) Použití čistých rozpouštědel postupně v pořadí podle jejich eluční síly označujeme jako *vícestupňová* eluce.
- 3) Eluce, při které se plynulou změnou vlastností mobilní fáze (pH, polarita) zvyšuje její eluční síla, se nazývá *gradientová*. Tento typ eluce zlepšuje a urychluje separaci složitějších směsí látek s různými fyzikálně-chemickými vlastnostmi. (5) (9)

U chromatografie vytěšňovací je vzorek opět dávkován jednorázově do proudu mobilní fáze u vstupu do kolony. Stacionární fází je adsorbent a mobilní fáze je vytěšňovacím činidlem, které v podstatě tlačí vzorek před sebou na cestě přes kolonu. Složky se mezi sebou z vazeb na povrchu stacionární fáze navzájem vytěšňují a kolonu opouštějí v pořadí podle narůstající adsorbovatelnosti. Mobilní fáze se adsorbuje silněji než analyzovaná směs a tak je látka s největší schopností adsorpce nakonec vytěšněna mobilní fází. (3)

2.2 VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE

2.2.1 Význam a využití

Od vynálezu chromatografické separace uplynulo již více než sto let. Během této doby se chromatografie značně vyvinula a stala se po vážení a měření pH třetí nejpoužívanější technikou v analytické chemii. (17)

Největších pokroků se dosáhlo ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii, která pro své výhodné vlastnosti také nachází největší praktické uplatnění. Kromě současně probíhajícího procesu separace a hodnocení kvality i kvantity, patří mezi přednosti HPLC také vysoká rychlost analýz, automatizace procesu, nenáročnost na množství vzorku a možnost použití velmi citlivých detektorů. Využití jednotlivých chromatografických systémů je dnes velmi rozmanité, v různých oborech se uplatňuje kvalitativní i kvantitativní analýza látek a směsí. Další možností využití je současná fyzická separace složek směsi (jímáním eluátu sběračem frakcí).

Ve farmaceutické analýze má HPLC nezastupitelný význam. V kontrole léčiv jedna analýza provedená za vhodných podmínek postačí k identifikaci (zkouška totožnosti), stanovení obsahu i čistoty léčiva. Validované metody HPLC separace jsou dnes obvyklou součástí lékopisného hodnocení léčiv. Chromatografický záznam analýzy zkoušeného léčiva se porovnává s údaji získanými analýzou standardu CRL, získaného od Evropské lékové komise.

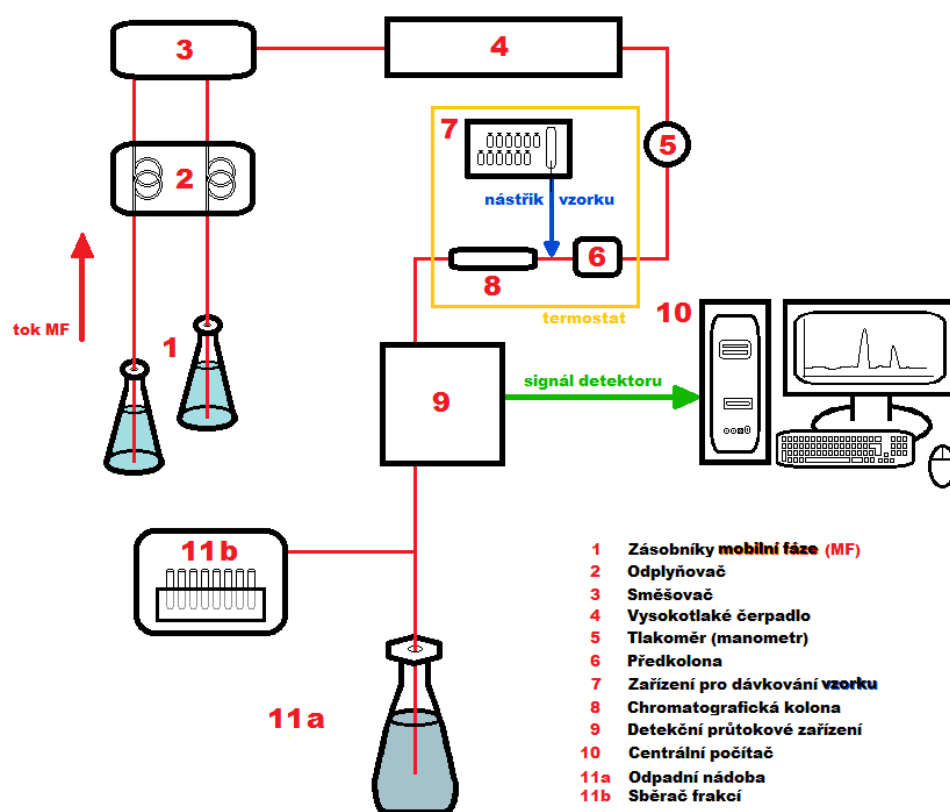
Ve studiích stability léčiv umožní HPLC sledovat postupný kvantitativní úbytek léčiva a zároveň hodnotit jeho rozkladné produkty po kvalitativní i kvantitativní stránce. Zdatným pomocníkem je také při analýze rostlinných materiálů (hodnocení obsahu přírodních léčiv v drogách). Uplatnění má i v klinické farmakologii při monitorování lékových hladin (TDM) v tělních tekutinách. Zde je předností HPLC analýz současné hodnocení léčiva a jeho metabolitů. Nezbytná je ale předchozí izolace látek z analyzované tělní tekutiny (extrakcí do vhodného rozpouštědla). TDM v současnosti nabývá stále více na významu, umožňuje totiž zvolit individuálnější přístup k pacientovi a tak pomáhá maximalizovat účinek a minimalizovat rizika farmakoterapie. (7)

2.2.2 Přístrojové uspořádání

2.2.2.1 Obecné schéma a základní součásti systému

Součásti, ze kterých je kapalinový chromatograf sestaven, lze shrnout do pěti základních celků:

- A. Součásti sloužící pro uchovávání mobilní fáze a zajišťující její plynulý pohyb systémem (zásobníky s filtry, odplyňovač, směšovač, čerpadla, tlumič pulsů).
- B. Zařízení pro dávkování vzorku.
- C. Separační systém (termostat s chromatografickou kolonou, předkolona).
- D. Průtokový systém detekce eluovaných látek (z detektoru proudí eluát do nádoby na odpad, popř. do sběrače frakcí).
- E. Datová stanice (snímá, zpracovává, uchovává a vyhodnocuje signál detektoru).



Obr. 1: Schéma kapalinového chromatografu

Schéma na obrázku je příkladem zapojení jednotlivých součástí systému, červená linie naznačuje průtok mobilní fáze. Takové uspořádání však není definitivní, jsou zde možnosti obměn (přidání, vyřazení či změna pořadí zapojení některých součástí). (9)

Celý chromatograf je zkonstruován tak, aby odolával vysokým tlakům. Používají se pevné inertní materiály, všechny spoje musí být dokonale těsné. Také je potřeba se vyvarovat vzniku příliš velkého mrtvého objemu v systému, který by negativně ovlivnil separaci složek nebo její rychlost. Z toho důvodu jsou spoje (hlavně v části systému za dávkovačem vzorku) vždy co nejkratší a kapilární.

(9) (10)

Technika HPLC je využívána ve velmi širokém měřítku a její možnosti nejsou zdaleka vyčerpány, neustále se zdokonaluje a nalézá nová uplatnění. Rostoucí požadavky na rychlost, účinnost a citlivost analýz vedou ke kontinuálnímu procesu rozvoje stacionárních fází i úpravám celého zařízení. Dalším důvodem inovací je snaha zvýšit odolnost a prodloužit životnost systému či dosáhnout vhodné selektivity separace. Současné trendy směřují hlavně k miniaturizaci celého zařízení s důrazem na automatizaci analýz, využití ultra vysokých tlaků a spojení LC-MS. (6)

Ad A.

V **zásobnících** mobilní fáze jsou ponořeny speciální filtry, které slouží k zachycení tuhých suspendovaných částic a přes které je mobilní fáze pomocí čerpadel nasávána do systému. Aby byl zajištěn její plynulý tok, pravidelně se kontroluje, jestli nejsou spoje vedoucí kapalnou fází k čerpadlu zprohýbané či zkřivené a zdali je filtr v mobilní fázi dostatečně ponořen. Zásobník musí být vždy umístěn výše než čerpadlo. Obvykle se používají nádoby z tlustého skla, jejichž hrdla musí být zakryta tak, aby uzávěr nebránil vyrovnávání rozdílu mezi atmosférickým tlakem a tlakem uvnitř zásobníku, ale aby omezil odpařování rozpouštědla ze zásobníku a chránil jeho obsah před znečištěním prachem.

Do **mobilní fáze** se používají komerčně dostupná organická rozpouštědla HPLC čistoty, která není nutné dále čistit. Voda pro HPLC musí také dosahovat čistoty pro HPLC (měrná vodivost pod $0,5 \mu\text{S}$), používá se ultračistá voda (obvykle

připravená reverzní osmózou). Při přidavku solí a pufrů do mobilní fáze je vždy nutné jejich roztoky zfiltrvat přes póry velké maximálně 0,45 μm . (12)

Mobilní fázi je dále nutné zbavit plynů, nejefektivnějším postupem je dnes zapojení vakuového **odplyňovače** (degaseru). V něm proudí mobilní fáze semipermeabilními kapilárami a plyny přechází vlivem gradientu tlaků do vakuové komory. (9)

K zajištění stabilního průtoku mobilní fáze slouží **vysokotlaké čerpadlo** (pumpa). Musí být vytvořen přetlak dostatečný pro průchod mobilní fáze náplní kolony a zároveň zabezpečen plynulý průtok nezbytný pro správnou funkci detektoru. Požadovány jsou pracovní tlaky v rozmezí běžně od 1 MPa do 40 MPa (v UHPLC systémech až do 100 MPa) a široce nastavitelný průtok (0,1 až 10 ml) se správností i přesností do 1 %.

Obvykle se používají pístová čerpadla. Jejich výhodou je schopnost vyvinutí vysokých maximálních tlaků při co nejmenším vnitřním objemu čerpadla. Tím je umožněna rychlá výměna mobilní fáze. Pohon pístu je mechanický, píst se pohybuje určitou frekvencí podle požadovaného průtoku. Nevýhodou je pulsní charakter čerpadla, který však lze potlačit pomocí dvoupístového uspořádání (popřípadě zařazením **tlumiče pulsů**).

O čerpadla je nutné správně pečovat, pravidelně je proplachovat. Intenzivní oplach pístů je obzvláště důležitý při použití pufrů v mobilní fázi, kdy je riziko krystalizace látek na povrchu pístu a v hlavě čerpadla zvýšené. (9) (10)

Při gradientové eluci lze v instrumentaci volit ze dvou variant provedení, v každém případě je nutné zařadit mezi součásti systému **směšovač** složek mobilní fáze. Rozlišují se dva typy tvorby gradientu. Pokud mísení složek mobilní fáze probíhá před vstupem do vysokotlakého čerpadla, jedná se o tvorbu nízkotlakého gradientu. Provádí se po odplynění kapalin podle programu ve směšovacím zařízení, pomocí otevírání a zavírání ventilů u jeho vstupu.

Méně přesná je pak tvorba vysokotlakého gradientu, kdy je na každý zásobník mobilní fáze napojeno jedno vysokotlaké čerpadlo. Mísení proudů probíhá až za čerpadly, za vysokého tlaku. Předností vysokotlakého gradientu je menší časové zpoždění (menší mrtvý objem) než při tvorbě gradientu nízkotlakého. (9)

Kontrola tlaku mobilní fáze před vstupem na kolonu se provádí **manometrem**.

Ad B.

Vzorek je nastříkovan na kolonu u jejího vstupu **dávkovačem** bez přerušení plynulého toku mobilní fáze. V současnosti je nejběžnější dávkování pomocí vysokotlakého přepínacího šesticestného (smyčkového) ventilu, který bývá součástí automatického dávkovače (autosampler). Jiné postupy jsou z důvodu zvyšujících se požadavků na automatizaci procesu a na odolnost proti tlaku již na ústupu.

Základem autosampleru je spojení injekční stříkačky se zásobníkem vzorků. Vzorky se zde uchovávají ve vialkách. Jsou to nádobky malých objemů (nejčastěji 2 ml) vyrobené ze světlého či tmavého skla, popřípadě z plastu. V případě velmi malého dostupného množství vzorku, lze do vialky vložit insert, který má objem pouze několik set μl . Vialky se obvykle uzavírají přitlačením pryžové přepážky na vialku šroubovacím uzávěrem. Autosamplery od různých výrobců se liší konstrukcí i principem vlastního dávkování. (9)

Ad C.

V případě potřeby je před chromatografickou kolonou, kde probíhá separace, zařazena **předkolona**. Je to snadno vyměnitelná kratší kolona (1-2 cm), která zachycuje nečistoty a silně zadržované látky a ochraňuje tak vlastní kolonu před poškozením. (18)

Místem setkání stacionární a mobilní fáze, kde se určuje selektivita a účinnost separace, je **chromatografická kolona**. Tato trubice vyplněná stacionární fází je těsně uzavřena vnějším pláštěm z nerezové oceli nebo skla. Na obou jejích koncích se nachází hlavice se vstupem pro našroubování kapiláry. Analytické kolony mohou být 1-30 cm dlouhé, s vnitřním průměrem v rozmezí 2-6 mm. Pro preparativní chromatografii se užívají delší a širší kolony, mohou dosahovat až dvojnásobných rozměrů oproti největším kolonám analytickým. (9) (19)

Kolony lze rozdělit podle charakteru jejich obsahu na **náplňové a monolitické**. Náplňové mají vnitřek tvořen rovnoměrně rozmístěnými sférickými částicemi o velkém povrchu. Částice obsahují různá množství pórů, účelem je zvětšení jejich povrchu pro vyšší účinnost separace. Používají se různé typy částic s průměrem 1-10 μm , obvykle však nepřesahuje 5 μm . Trendy ve vývoji ve snaze zrychlit difuzní procesy nadále pokračují zmenšováním velikosti částic, další

inovace spočívají v použití jiných materiálů a v úpravě struktury částic (neporézní, povrchově porézní, perfuzní se dvěma typy pórů) nebo celé matrice (monolitické kolony). (8)

S rozměry částic sorbentu souvisí také volba délky kolony. Při zmenšování velikosti částic roste odpor vůči toku mobilní fáze a tím hodnota tlaku, který je potřebný pro dosažení požadovaného průtoku. Při použití vyššího tlaku se však zvýší nároky na odolnost zařízení, proto se problém zvyšujícího se tlaku řeší nejprve zkracováním délky kolony. Účinnost kolony sice zkrácením teoreticky klesá, ale celková účinnost je vzhledem k jejímu současnému zvýšení vlivem zmenšení velikosti částic zachována. Menší objem kolony je i přesto výhodný, analýza se zrychluje. Příkladem využití rychlé chromatografie na krátkých kolonách je vysokopropustná analýza kombinatoriálních knihoven (stovky až tisíce analýz denně).

Trend miniaturizace systému pokračuje zužováním kolon. Cílem není jen zrychlení analýzy, ale i zlepšit ekonomiku a ekologii provozu snížením spotřeby rozpouštědel a produkce odpadů. Další využitelnou výhodou je snížení nároků na množství vzorku. (8)

Výplň monolitických kolon je tvořena pouze jedním kusem porézního sorbentu. Obsahuje dva druhy pórů – makropóry o průměru cca 2 μm , sloužící k transportu mobilní fáze a mnohem menší mesopóry, cca 10 nm, s velkým povrchem pro separaci. Monolitický sorbent zaujímá v koloně menší objem než částicové náplně a tak umožňuje zrychlení průtoku mobilní fáze bez zvýšení tlaku či snížení účinnosti separace. Další jeho výhodou je nepřítomnost mezičásticových prostorů, která zajišťuje průtok veškeré mobilní fáze skrz póry. (13) (17) (19)

Umístění kolony i některých dalších součástí HPLC systému do **termostatu** umožňuje nastavení teploty vhodné pro separaci. Teplota ovlivňuje viskozitu mobilní fáze i rovnovážné konstanty látek. Termostat má zajišťovat rovnoměrné rozložení teploty v prostoru a bránit jejím změnám. Zvýšení teploty separace otvírá nové možnosti při výběru mobilní fáze (snížení viskozity zlepšuje přenos částic, selektivita separace se mění s posunem rovnováhy interakcí). (17)

Ad D.

Z kolony proudí mobilní fáze do průtokového **detektoru**. Snímán je rozdíl odezvy detektoru při průtoku samotné mobilní fáze a při průtoku fáze s analytem. Odezva vzniká převedením fyzikálních či chemických vlastností látek na elektrický signál o velikosti úměrné jejich koncentraci. (Rozsah koncentrací, pro které úměra platí, se nazývá „lineární dynamický rozsah“.)

Výběr detektoru správných vlastností se výrazně odráží ve výsledcích analýz. V četnosti využití vynikají detektory spektrofotometrické, fluorescenční a stále více také vysoce univerzální a citlivé hmotnostní spektrometry, jejichž spojení s chromatografií je i přes vysokou finanční nákladnost značným přínosem.

V preparativní chromatografii, kde je cílem složky při analýze separovat i fyzicky a jímat jednotlivé frakce, se za detektor připojuje **sběrač frakcí**.

Ad E.

Signál detektoru je v současnosti snímán, zaznamenáván i zpracováván jedním zařízením – **počítačem**. S pomocí chromatografického softwaru je dnes počítačově řízen celý proces analýzy. (10) (19) (20)

2.2.2.2 Stacionární fáze pro HPLC systémy

Přehled nejčastějších aplikací a vlastností stacionárních fází rozdělených podle materiálu použitého pro jejich výrobu:

Stacionární fáze na bázi silikagelu

Nejpoužívanějším materiálem pro výrobu sorbentů je hydratovaný oxid křemičitý – silikagel, mechanicky odolný materiál, jehož povrch lze snadno modifikovat. Používá se pro výrobu monodisperzních částic s definovanou velikostí a distribucí pórů i pro výrobu monolitických stacionárních fází.

Voda je vázána za vzniku silanolových skupin, které jsou příčinou polaritity a reaktivity povrchu silikagelu. Jeho vlastnosti jsou ovlivněny množstvím a typem těchto skupin, které vykazují rozdílnou kyselost a mohou se chovat jako měniče kationtů. Povrch silikagelu lze použít jako sorbent pro NP-HPLC a HILIC, většinou se však modifikuje navázáním funkčních skupin reakcí silanolů

s organosilany. Takto se připravují kovalentně vázané stacionární fáze s různou polaritou nebo nepolární pro RP-HPLC. Navázáním iontových nebo ionizovatelných skupin získáme stacionární fáze pro IEC. Modifikací povrchu opticky aktivní látkou se vytváří chirální prostředí pro separaci stereoizomerů.

Sterické bránění neumožňuje modifikaci celého povrchu a zbytkové volné silanoly negativně ovlivňují vlastnosti povrchu sorbentu. Vznik nežádoucích elektrostatických interakcí bazických látek s ionizovanými silanoly je výrazným problémem zejména ve farmaceutické analýze, kde většina léčiv má bazický charakter. Tento problém nelze řešit úpravou pH prostředí, protože hlavním nedostatkem silikagelu je jeho omezená chemická stabilita, vydrží v rozmezí pH 2-8. V bazickém prostředí se silikagelová matrice rozpouští, v silně kyselém dochází k hydrolýze navázaných funkčních skupin. Vývoj stacionárních fází tedy směřuje ke zvyšování odolnosti silikagelu vůči těmto jevům.

Příklady modifikace silikagelu:

- zastínění matrice použitím objemnějších a hydrofobnějších organosilanů k modifikaci fáze (C18 > C8);
- použití stericky chráněných organosilanů s postranními objemnými substituenty (isobutyly nebo isopropyly);
- tzv. „endcapping“, dodatečná modifikace zbylých volných silanolových skupin blízko povrchu silikagelu reakcí s malými organosilany (trimethylchlorsilany).

Velký vliv na výsledné vlastnosti kovalentně vázaných fází má kvalita výchozího silikagelu před jeho úpravou, zejména obsah kovových nečistot (zvyšují kyselost) a množství a distribuce silanolů (izolované skupiny jsou kyselější). Připravují se ultračisté tzv. bazicky deaktivované fáze (silikagel typu B) s homogenní distribucí silanolových skupin. (6) (8) (10) (13)

Stacionární fáze na bázi oxidu zirkoničitého

Mnohem méně využívané stacionární fáze s odlišnou selektivitou jsou založeny na bázi oxidů kovů (oxid hlinitý, titaničitý, zirkoničitý). Interakce na jejich povrchu jsou složitější než u silikagelu, volba pufru a jeho koncentrace má při separaci na těchto fázích mnohem větší vliv. Nejčastěji používaný je oxid zirkoničitý. Má amfoterní charakter, může se tedy podle pH použité mobilní fáze chovat jako měnič kationtů nebo měnič aniontů. Další interakcí povrchu oxidu je

ligandová výměna, která probíhá na koordinačně nenasyceném atomu zirkonia, jenž zde vystupuje jako Lewisova kyselina. Hydrofobizace povrchu pro separaci na RP spočívá v modifikaci polybutadienem či polystyrenem. Výsledné stacionární fáze se vyznačují vysokou tepelnou a chemickou stabilitou. Je tak umožněno optimalizovat složení mobilní fáze pouze podle vlastností analytů. Separace při vysokých teplotách má kromě zrychlení analýzy další výhody. Například umožňuje snížit spotřebu organických rozpouštědel náhradou za vodné mobilní fáze s využitím toho, že polarita vody je při vysoké teplotě značně snížena. (8) (14)

Polymerní stacionární fáze

Velký adsorpční povrch mají také makroporézní struktury polymerních stacionárních fází (například polystyren, substituované methakryláty a polyvinylalkoholy). Polymery jsou i přes vysokou chemickou a termální stabilitu velmi málo využívané, účinnost separace je závislá na organické složce mobilní fáze a je všeobecně nižší než při použití chemicky vázaných fází. Další nevýhodou polymerních sorbentů je jejich omezená stabilita mechanická (do 20 MPa) a stabilita funkčních skupin polymeru. (13) (14)

Hybridní stacionární fáze

Ve snaze o zvýšení stability silikagelu byly vyvinuty hybridní částice. Hybridní sorbenty kombinují výhodné vlastnosti silikagelu (mechanická odolnost, vysoká účinnost) a polymerů (chemická a tepelná odolnost). Vývoj nových hybridních stacionárních fází a jejich rostoucí stabilita umožňuje například použití vysokých tlaků při rychlé chromatografii (UPLC). (14)

Stacionární fáze na bázi porézního grafitického karbonu

Materiálem s velmi odlišnou selektivitou jsou porézní částice uhlíku. Použitelný je v širokém rozmezí pH i teplot, jeho mechanická odolnost a účinnost jsou však nižší. Jeho citlivost ke sterickým a izomerním rozdílům je vysoká, malé využití tedy nalézá při separaci polohových izomerů a chirálních látek. (13) (14)

2.2.2.3 Detektory v HPLC

Výběr detektoru v HPLC určuje citlivost a selektivitu analýzy. Citlivost je nejmenší hodnota změny koncentrace analytu, jakou je metoda schopna rozlišovat, nezávisle na chromatografických podmínkách. Volba mezi selektivitou a univerzálností detektoru závisí na zamýšleném použití systému.

Základní požadovanou vlastností detektoru je citlivá, stabilní, reprodukovatelná a rychlá odezva, nezávislá na vnějších vlivech (teplota, složení, průtok mobilní fáze). Detektor má být schopen poskytovat informace o kvalitě analytů a hodnotit jejich kvantitu v širokém lineárním dynamickém rozsahu. Objem detekční cely musí být co nejmenší, aby nedocházelo ke zbytečnému rozmývání chromatografických zón. Upřednostňovány jsou detektory nedestruktivní (nemění v průběhu analýzy chemické složení vzorku) a nastavitelné (s možností optimalizace odezvy pro jednotlivé látky). (10) (20)

Následuje přehled nejpoužívanějších detektorů pro HPLC a jejich vlastností.

UV-VIS spektrofotometrické detektory

Výhodou těchto detektorů je jejich univerzálnost, dobrá citlivost (10^{-9} až 10^{-10} g.ml⁻¹) a robustnost (míra vlivu proměnných podmínek analýzy na odezvu detektoru). UV-VIS detekce je v HPLC nejčastější, lze ji využít i při gradientové eluci. Je založena na interakci látek s monochromatickým elektromagnetickým zářením ultrafialové (UV 200-400 nm) nebo viditelné (VIS 400-800 nm) oblasti spektra. Zdrojem záření je deuteriová (UV) nebo wolframová (VIS) lampa. Záření je látkou absorbováno, jeho intenzita se po průchodu průtokovou detekční celou mění.

Absorbance (A) závisí jednak na vlnové délce měření (λ), jednak na přítomnosti absorbujících funkčních skupin v látce – tzv. chromofor (především v UV oblasti absorbuje většina látek – konjugované dvojné vazby, nevazebné π -elektrony). Výběrem vhodné vlnové délky lze zvýšit citlivost odezvy. Většinou se měří při vlnové délce absorpčního maxima látky, ale je nutné také zohlednit složení mobilní fáze i balastní látky ve vzorku. Použitá rozpouštědla v UV-VIS oblasti nesmí absorbovat. Využitím Lambertova-Beerova zákona se získávají kvantitativní údaje, existuje přímá závislost odezvy detektoru (absorbance A) na délce cely l (tj. tloušťka absorbující vrstvy) a koncentraci analytu c ($A = c \cdot l \cdot \epsilon$;

kde ϵ je molární absorpční koeficient v $\text{l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$). Rozsah linearity odezvy je široký. Vliv vlnové délky a teploty není v zákoně zahrnut, při možných velkých teplotních výkyvech v průběhu měření je vhodné celou temperovat.

Spektrofotometrické detektory existují v několika provedeních:

- 1) Nejstarší jsou detektory s fixní vlnovou délkou záření 254 nm nebo 280 nm a v analýze léčiv se s jejich použitím již nesetkáme.
- 2) Nejčastěji využívanými detektory jsou detektory s proměnnou vlnovou délkou, umožňuje nastavením vlnové délky měnit citlivost a selektivitu během analýzy.
- 3) Nejsložitější detektory s diodovým polem (DAD nebo PDA detektor) jsou tvořeny polem diod nebo fotodiod a během analýzy snímají absorpční spektra analytů v závislosti na čase. Zisk UV spekter umožňuje zvolit pro každou látku zvlášť vhodnou vlnovou délku detekce. Ze záznamů DAD detektoru pak software dokáže vyhodnotit také tzv. čistotu píku (porovnává poměry absorbancí při různých vlnových délkách) a případně odhalit koeluci nečistot. (7) (10) (20)

Fluorimetrické detektory

Tyto detektory jsou selektivnější a citlivější (10^{-9} až 10^{-12} g.mol^{-1}), lze je opět využít při gradientové eluci. Jsou selektivní pro léčiva, jež vykazují fluorescenci (asi 10 % organických sloučenin) nebo jejichž metabolity či rozkladné produkty fluoreskují. Vhodnými činidly lze také některé další látky převést na fluoreskující deriváty.

Fluorescence následuje po absorpci elektromagnetického záření molekulou fluoreskující látky. Molekula přechází do excitovaného elektronového stavu, ve kterém setrvá jen chvíli po odstranění zdroje záření. Poté se vrací do základního stavu a přebytečné energie se zbavuje v podobě tepla a emisního záření o vyšší vlnové délce, než byla délka excitačního záření. Intenzita emisního záření je úměrná koncentraci látky. (10) (20)

Elektrochemické detektory

Výhodou elektrochemických detektorů je vysoká citlivost (10^{-9} až 10^{-12} g.mol^{-1}) a selektivita. Uplatnění elektrochemických detektorů je však omezené, detekovat lze pouze látky, které jsou schopné oxidace nebo redukce. Snadnějším postupem

v praxi je látky oxidovat, pro provedení redukce je totiž nutné odstranit kyslík z mobilní fáze. Dalším omezením pro použití elektrochemické detekce je její robustnost, přítomnost kyslíku, halogenů či kovů může značně zvýšit šum a drift základní linie. Proto jsou kladeny vysoké nároky na čistotu mobilní fáze a detekci nelze použít při gradientové eluci.

V detekční cele se měří změna elektrické veličiny, která je způsobena rozpuštěnými analyty (látky s fenolickou, diazo, amino nebo nitro skupinu, katecholaminy, glykoproteiny). Podle měřené veličiny rozlišujeme typ detektoru.

V HPLC analýze mají využití následující:

AMPÉROMETRICKÉ DETEKTORY

Jsou to nejčastěji používané elektrochemické detektory v HPLC, při konstantním napětí se měří limitní proudy vzniklé během oxidace či redukce látek. Uplatnění nacházejí při detekci katecholaminů, acetylcholinu, kyseliny askorbové, nitrosloučenin, cukrů, hydroxylaminů a makrocyclických antibiotik.

KONDUKTOMETRICKÉ DETEKTORY

Jednoduché a univerzální konduktometrické detektory jsou používané pro IEC. Měří vodivost mobilní fáze před a během eluce analytů. Vodivost je značně ovlivněna teplotou, proto je nutné termostatování detektoru. Uplatňuje se při zpracování vody (jako mobilní fáze je zde používána voda deionizovaná).

COULOMETRICKÉ DETEKTORY

Tyto detektory využívají elektrolýzy analytu na povrchu elektrody pro generaci proudu, jehož velikost závisí na koncentraci analytu a na podmínkách přeměny. Potenciostat pak změří výstupní napětí, na které je vzniklý proud přeměněn. Detektory jsou velmi citlivé a selektivní (pro látky schopné se oxidovat či redukovat v elektrickém poli), v HPLC jsou často využívány. Umožňují stanovit oxidovatelné/redukovatelné sloučeniny i ve složité směsi látek, což je výhodné u stanovení přirozených antioxidantů, uplatnění nalézají také například při stanovení katecholaminů.

COULARRAY DETEKTOR S ELEKTRODOVÝM POLEM

Tato obdoba detektoru s fotodiodovým polem se vyznačuje mnohonásobně lepší citlivostí (10-1000x) a selektivitou než spektrofotometrický detektor. Využívá se například k detekci flavonoidů a fenolických látek, pesticidů a herbicidů

v životním prostředí a pro stanovení malých množství lékových metabolitů při klinických studiích. (7) (10) (20)

Refraktometrické detektory (RID)

Omezené využití má pro své nevýhody univerzální diferenciální refraktometrický detektor. Zaznamenává se rozdíl mezi indexem lomu čisté mobilní fáze v referenční cele a indexem lomu eluentu protékajícího přes měrnou celu a převádí jej na napětí. Lze takto analyzovat všechny typy látek, analýza je však limitována nízkou citlivostí detektoru ($10^{-6} \text{ g.ml}^{-1}$). Každá změna složení mobilní fáze výrazně ovlivňuje odezvu detektoru, nelze jej použít pro gradientovou eluci a kvůli závislosti indexu lomu na teplotě je vždy nutné celu temperovat.

(7) (10) (20)

Detektory na bázi aerosolu

Moderní univerzální detektory využívají nebulizace – zmlžení eluentu v proudě dusíku za vzniku aerosolových kapek a jejich následné zahřátí a odpaření mobilní fáze. Takto lze analyzovat jakékoliv netěkavé a semitěkavé látky bez ohledu na její fyzikálně-chemické vlastnosti a nepřítomnost chromoforu ve struktuře. Univerzální aerosolové detektory našly široké využití v potravinářské a farmaceutické analýze. Hlavní rozdíly mezi jednotlivými typy univerzálních detektorů spočívají v principu detekce vzniklých částic vzorku. (10)

EVAPORATIVE LIGHT SCATTERING DETECTOR (ELSD)

Tento typ nebulizačního detektoru využívá rozptylu světla částicemi. V průtokové detekční cele se částice střetnou s paprskem laseru, měří se intenzita světla rozptýleného částicemi a převádí se na elektrický signál. Tento detektor má citlivější odezvu než refraktometrický ($10^{-8} \text{ g.ml}^{-1}$) a umožňuje gradientovou eluci. Využívá se, díky svým některým výhodám oproti ostatním metodám s vyšší citlivostí a linearitou (univerzálnost, nižší cena, snadná obsluha přístroje), hlavně při analýzách látek, které neabsorbují záření v UV-VIS oblasti a nevykazují fluorescenci. (10) (14)

CHARGED AEROSOL DETECTOR (CAD)

Typ zvaný také Corona CAD je citlivější typ univerzálního aerosolového detektoru, založen na jiném principu detekce. Po nebulizaci a odpaření mobilní

fáze je na částice převeden pozitivní náboj. Nabitý aerosol vzniká pomocí sekundárního proudu dusíku nabitého koronárním výbojem. Po přenosu náboje do kolektoru se elektrometrem měří generovaný proud. CAD je lépe využitelný při kvantitativní analýze než ELSD, především díky své stabilitě a reprodukovatelnosti odezvy v širokém lineárním rozsahu. (14) (20)

Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je velmi citlivá a finančně náročná destruktivní technika detekce. Princip spočívá v převedení látek na ionty a jejich separaci podle hmotnosti a velikosti náboje. Výstupní záznam, kterým je hmotnostní spektrum – závislost četnosti iontů na poměru hmotnosti a náboje (m/z), poskytuje řadu údajů využitelných pro mnohé aplikace. Umožňuje strukturní analýzu, identifikaci i stopových množství látek a také jejich selektivní a citlivé stanovení. Výhodné a také stále častěji používané je spojení hmotnostní spektrometrie se separačními metodami (nejvíce s GC a HPLC, obzvlášť UPLC). Po rozdělení směsi lze takto ihned získat informace o struktuře látek nebo je přímo identifikovat.

Při spojení LC-MS je po výstupu eluátu z chromatografické kolony oddělena mobilní fáze a molekuly vzorku v plynném stavu jsou převáděny na ionty. Ionty jsou dále převedeny do vakuového systému. Zde jsou v analyzátoru separovány podle poměru m/z , urychleny a dále detekovány v detektoru, zesílený signál je pak veden do počítače se softwarem sloužícím ke sběru a zpracování dat i k ovládání celého systému.

Ionizační technika se vybírá s ohledem na vlastnosti látek, používají se termoionizace, elektroionizace, chemické ionizace nebo fotoionizace za atmosférického tlaku. Při separaci v analyzátoru se využívá rozdílné rychlosti letu nabitých fragmentů a molekul či rozdílů v jejich chování ve vysokofrekvenčním nebo magnetickém poli. (7) (10) (21)

2.2.3 Vyhodnocení analýzy

Výstupní záznam HPLC analýzy se nazývá chromatogram, zobrazuje závislost intenzity odezvy detektoru na čase. Analyt se při průtoku kolonou nachází

v homogenní koncentraci v úzkém pásu. Tato zóna je pak detekována a zaznamenána v podobě křivky gaussovského tvaru, tzv. píku.

2.2.3.1 Základní charakteristiky

Retenční (eluční) čas t_R je doba od nástřiku vzorku, za kterou dosáhne pík analytu svého maxima. Je závislý na rychlosti průtoku mobilní fáze. Objem, který za tuto dobu systémem proteče se nazývá retenční objem V_R . Lze ho vypočítat jako součin retenčního času a průtokové rychlosti. Doba průtoku látky, která není vůbec zadržována na koloně, je označena jako mrtvý retenční čas t_M . Jeho odečtením od retenčního času t_R získáme redukovaný retenční čas t_R' udávající dobu interakce analytu se stacionární fází.

Retenční faktor k (= kapacitní faktor k') je bezrozměrná veličina, jejíž hodnotu lze získat podílem redukovaného a mrtvého retenčního času. Porovnává tedy čas interakce analytu se stacionární a s mobilní fází. Popisuje tak míru retence analytu bez vlivu průtoku mobilní fáze a rozměrů kolony. Míra sorpce na koloně, tedy její kapacita, může být vyjádřena rovněž jako hmotnostně distribuční poměr D_m , tedy podíl hmotností rozpuštěné látky ve stacionární fázi a v mobilní fázi.

Kvalita systému je dále charakterizována selektivitou α , která vyjadřuje jeho schopnost rozlišit dva různé analyty. Její hodnotu lze získat se podílem retenčních faktorů těchto analytů. Míra separace dvou píků je lépe popsána rozlišením R , definovaným vztahem $R = 1,18 \cdot (t_{R2} - t_{R1}) / (w_{h2} + w_{h1})$, kde w_h je šířka píku v polovině jeho výšky vyjádřená v jednotkách času. (22)

Účinnost je definována jako stupeň rozmytí zóny analytu. Pro její vyjádření se využívá teorie teoretických pater. Jsou to pomyslné oddělené vrstvy v koloně, ve kterých se analyt vyskytuje vždy po určitou dobu (do ustálení rovnováhy mezi jeho množstvím ve stacionární a mobilní fázi). Čím větší je počet teoretických pater N (a menší jejich výška), tím lepší je přechod mezi fázemi a tedy i zdánlivá účinnost separace. Pro výpočet počtu teoretických pater lze použít vztah $N = 5,545 \cdot (t_R / w_h)^2$. Na základě této hodnoty nelze však porovnávat kolony s různou délkou. K tomuto účelu slouží tzv. výškový ekvivalent teoretického patra H , který se počítá jako podíl délky kolony a počtu teoretických pater ($H = L/N$, kde L je délka kolony).

Některé uvedené charakteristiky jsou spolu s dalšími parametry (správnost, přesnost, opakovatelnost, reprodukovatelnost, LOD, LOQ, linearita, faktor symetrie píku, poměr signálu k šumu) hodnoceny při validaci jednotlivých metod. Některé jsou pak vybrány a kontrolovány při aplikaci validované metody, provádí se tzv. test způsobilosti chromatografického systému (neprovádí se znovu celá validace). (7)

2.2.3.2 Kvalitativní analýza

Pro identifikaci látky slouží její retenční čas. Tento parametr je závislý nejen na vlastnostech látky, ale i na podmínkách analýzy, a není pro danou látku unikátní. Je proto nutné porovnání s chromatogramem standardu. Při porovnávání s chromatogramem z knihovny je nutné dodržet přesně stanovené podmínky a při srovnání chromatogramů standard látky CRL a vzorku provádět obě separace za přesně shodných podmínek.

2.2.3.3 Kvantitativní analýza

Parametrem kvantity je plocha píku A (popř. jeho výška h). Plocha píku je přímo úměrná koncentraci analytu. Stanovení obsahu lze provést následujícími způsoby:

Metoda vnějšího standardu

Analýza probíhá ve dvou krocích, stanovovaná látka a standard se nástřikují každý samostatně. Koncentrace se stanovuje porovnáním ploch píků látky a standardu, předpokladem je přímá úměra koncentrace a plochy píku na obou chromatogramech. Jako vnější standard se obvykle používá standard stanovované látky (CRL).

Metoda vnitřního standardu

Princip spočívá rovněž ve využití poměru ploch píků analytů a ploch píků referenčních látek, ale k oběma roztokům vzorků se navíc přidá stejné definované množství vnitřního standardu. Ve výpočtu se pak používají místo plochy vzorku a plochy standardu jejich poměry k plochám vnitřního standardu. Metoda přesnější než metoda vnějšího standardu, která bývá zatížena chybou dvojího nástřiku (obzvlášť je-li nutné vzorky před nástřikem upravovat). Vnitřní standard je zvolen

tak, aby nijak nerušil stanovení složek vzorku, musí být chemicky inertní, jeho fyzikálně-chemické vlastnosti, struktura a koncentrace by měly být podobné jako u analyzovaných látek. Pak by se měl jeho retenční čas pohybovat v okolí retenčních časů analytů a odezva detektoru by měla být rovněž obdobná jako u stanovovaných látek.

Kalibrace

Metoda spočívá v analýze série vzorků o stoupající koncentraci v určitém rozmezí, sestrojení grafu závislosti odezvy na koncentraci a určení kalibrační funkce. V kapalinové chromatografii je závislost odezvy (poměr ploch vzorku a vnitřního standardu) na koncentraci většinou lineární a kalibrační křivku tak lze popsat pomocí rovnice přímky ($y = a \cdot x + b$) i vypočítat její směrnici. Koncentraci velkého množství testovaných vzorků pak již snadno a rychle spočítáme dosazením výsledků analýz za hodnoty na ose y.

Normalizace

Metoda vyjadřuje koncentraci složek vzorku jako procentuální část celkové plochy všech píků chromatogramu. Výjimkou jsou píky pod limitem zanedbatelnosti a píky rozpouštědel, které se do celkové plochy nezapočítávají. Aby bylo možné metodu pro dané stanovení použít, musí být odezva detektoru pro všechny analyty stejná. Pokud tomu tak není, lze využít korekčních faktorů uvedených v lékopise. Využívá se především v hodnocení čistoty a stability.

Metoda standardního přídavku

Používá se v případech, kdy není možné získat prázdný vzorek (bez analytu) a tudíž ani připravit referenční standard s definovaným množstvím analytu (například u analýzy biologického materiálu). Místo něj se tedy hodnocený vzorek porovnává se současně připraveným referenčním vzorkem s přidaným známým množstvím látky. Porovnáním výsledků lze dopočítat koncentraci analytu v neznámém vzorku. (7) (10) (23)

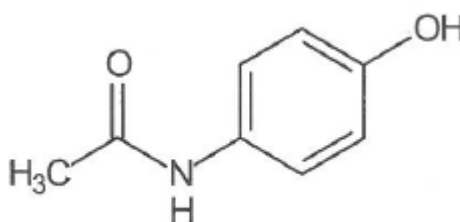
2.3 VLASTNOSTI ANALYZOVANÝCH LÁTEK

2.3.1 Paracetamol

FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÉ VLASTNOSTI

Lékopisný název: Paracetamolum

Strukturní vzorec:



Obr. 2: Strukturní vzorec paracetamolu. Zdroj: ČL2009, str. 2859.

Chemický název: *N*-(4-hydroxyfenyl)acetamid (IUPAC) (22) (24)

N-acetyl-*p*-aminofenol

p-Hydroxyacetanilid

Generický název: Paracetamol (INN)

Acetaminofen (USAN)

Sumární vzorec: C₈ H₉ N O₂

M_r = 151,16

Krystalický prášek, bílý nebo téměř bílý.

Rozpustný mírně ve vodě, snadno v ethanolu 96 %, velmi těžce v dichlormethanu.

Teplota tání 168 °C až 172 °C.

(22)

FARMAKOLOGICKÉ VLASTNOSTI

Farmakodynamika: Paracetamol se podle ATC klasifikace řadí do farmakoterapeutické skupiny analgetik, antipyretik, anilidů (ATC kód N02BE01

pro monokomponentní léčivé přípravky, N02BE51 a N02BE71 pro kombinované léčivé přípravky). Je to celosvětově rozšířené léčivo, jehož analgetický a antipyretický účinek je využíván již od poloviny 20. století. Mechanismus působení tohoto neopioidního analgetika není úplně objasněn. Paracetamol vykazuje analgetický a antipyretický účinek intenzitou srovnatelný s kyselinou acetylsalicylovou, antiflogistické a antiagregační účinky však postrádá. Zasahuje stejně jako NSAIDs do syntézy prostaglandinů ovlivněním enzymů cyklooxygenáz, působí ale převážně v CNS a periferní izoformy enzymů (COX₁ a COX₂) inhibuje pouze velmi slabě. (25) (26) (27) (28)

Farmakokinetika: Absorpce paracetamolu z gastrointestinálního traktu i rekta je rychlá a téměř úplná. Účinek paracetamolu nastupuje během 30 minut a trvá 3-4 hodiny. Maximální plazmatická koncentrace je dosažena do 2 hodin. Distribuuje se do všech tělesných tkání a tělních tekutin, prochází hematoencefalickou i placentární bariérou, je vylučován do slin a mateřského mléka. Biotransformace paracetamolu probíhá v játrech převážně konjugací se sulfátem a glukuronátem, exkrece ledvinami. Malý podíl paracetamolu v játrech se metabolizuje oxidačními pochody za vzniku reaktivního toxického metabolitu N-acetyl-p-benzoquinon-iminu (NAPQI), který se při podání terapeutických dávek ihned inaktivuje vazbou na glutathion. Biologický poločas je obvykle 1-3 h, prodlužuje se při závažné jaterní insuficienci (až na 5 h). (2) (25) (28) (29)

KLINICKÉ ÚDAJE

Indikace: Monokomponentní či kombinované léčivé přípravky s paracetamolem se používají pro zmírnění slabých až středně silných bolestí různé etiologie (bolest hlavy, dentální bolest, dysmenorea, neuralgie, muskuloskeletární bolest vertebrogenního či revmatického původu, artrotická bolest velkých kloubů, pooperační bolest, nádorová bolest). Kombinace s opioidy, NSAIDs nebo kofeinem zvyšuje analgetický účinek paracetamolu. Další indikací paracetamolu je snížení horečky a tlumení bolestí při akutních infekčních onemocněních, bývá součástí kombinovaných léčivých přípravků s antihistaminiky, sympatomimetiky, antitusiky nebo vitamínem C.

Paracetamol je v terapeutických dávkách velmi bezpečným léčivem s minimem nežádoucích účinků a lékových interakcí. Je proto analgetikem první volby pro

všechny věkové kategorie (vždy ve vhodné lékové formě), lze jej krátkodobě užívat i v těhotenství a při laktaci. Dostupné jsou perorální nebo rektální lékové formy – tablety, kapsle, prášek nebo granulát nebo tablety pro přípravu perorálního roztoku, sirup, suspenze a čípky. (25) (28)

Dávkování: Pro dospělého je doporučená jednotlivá dávka 500-1000 mg nejdříve po 4 hodinách a maximální denní dávka 4000 mg (při dlouhodobé terapii 2500 mg), v pediatrii je dávkování definováno na základě hmotnosti dítěte. Je stanovena jednotlivá analgetická dávka paracetamolu 10-15 mg/kg a maximální denní dávka 60 mg/kg. Pro děti mladší než 6 let jsou určeny lékové formy umožňující přesnější a pohodlnější podání dávky.

Optimální doporučené dávkování paracetamolu by se však mělo řídit tělesnou hmotností pacienta i u dospělých. Užití jednotlivé dávky 500 mg je povoleno až u dětí s hmotností 34 kg a více. U osob s hmotností vyšší než 50 kg hrozí ale při jednotlivé dávce 500 mg paracetamolu poddávkování. Přiměřená jednotlivá dávka pro osoby s hmotností 51-70 kg je 750 mg paracetamolu po 4 h a pro osoby s hmotností 71-100 kg dávka 1000 mg paracetamolu po 4 hodinách. Při poruchách funkce ledvin je nutné prodloužit dávkový interval na 6 až 8 hodin. (25) (29) (30)

Kontraindikace: Hypersenzitivita na paracetamol a další léčivé či pomocné látky obsažené v přípravku, těžké formy hemolytické anemie a jaterní insuficience, akutní hepatitida. Kontraindikováno je pití alkoholu během léčby.

Opatrnosti je třeba při deficitu glukoso-6-fosfátdehydrogenázy a při těžších poruchách funkce jater nebo ledvin, zvyšuje se riziko předávkování. Užívání vyšších dávek nebo dlouhodobé podávání paracetamolu v pediatrii, zejména u dětí do 10 let, zvyšuje riziko poškození jater a ledvin. Pro terapii horečky u dětí je proto za bezpečnější považován ibuprofen. (25) (27) (29)

Lékové interakce: Alkohol, hepatotoxická léčiva a induktory jaterních enzymů zvyšují toxicitu paracetamolu. Při dlouhodobém podávání paracetamolu v denních dávkách vyšších než 2 g může být zvýšen účinek terapie perorálními antikoagulancii, doporučuje se proto kontrola protrombinového času.

Nežádoucí účinky: Výskyt nežádoucích účinků při podávání terapeutických dávek paracetamolu je spíše výjimečný, vzácně se objevuje vyrážka, kožní alergie a pouze velmi vzácně bronchospasmus, žloutenka nebo poruchy krvetvorby.

Toxicita: Při podávání vysokých dávek se vyčerpají zásoby glutathionu a nedojde tak k dostatečné inaktivaci NAPQI, který může způsobit závažné poškození jater a méně častou renální tubulární nekrózu. Prvotními příznaky jsou nauzea, zvracení, bolest břicha a po uplynutí nejméně 24 hodin dochází k hepatorenálnímu selhávání s typickými symptomy. Hepatotoxicita paracetamolu je závislá na dávce, vyvolána je denní dávkou 150 mg/kg. Intoxikace dávkou vyšší než 200 mg/kg je bez včasného zahájení terapie smrtelná. Poškození jater může být v případě, že je ovlivněna biotransformace nebo exkrece paracetamolu, vyvoláno i při dodržení doporučených terapeutických dávek paracetamolu. Při onemocnění ledvin nebo jater je nezbytné dávkování pozměnit (prodloužením dávkového intervalu nebo redukcí maximální jednotlivé dávky). Riziko kumulace paracetamolu v těle a následného předávkování se zvyšuje také při jeho současném podávání s hepatotoxickými léčivými či alkoholem. Induktory mikrosomálních enzymů ovlivňují toxicitu paracetamolu zvýšením podílu oxidačních produktů při jeho biotransformaci. Riziko poškození jater paracetamolem je při chronickém pití alkoholu nebo při užívání léčiv ze skupiny induktorů jaterních enzymů větší.

Při intoxikaci paracetamolem je vždy nezbytná hospitalizace pacienta. Co nejrychlejší podání aktivního uhlí může pomoci snížit absorpci paracetamolu. Další postup spočívá v podání antidota acetylcysteinu, obvykle infuzí v 5% roztoku glukózy, ale lze ho podat i perorálně.

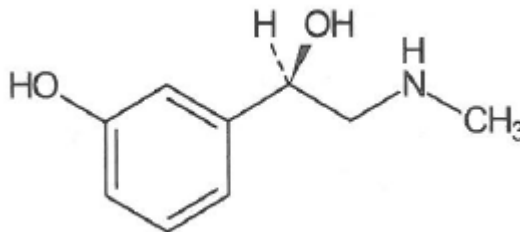
(25) (28)

2.3.2 Fenylefrin a fenylefrin-hydrochlorid

FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÉ VLASTNOSTI

Lékopisný název: Phenylephrinum

Strukturní vzorec:



Obr. 3: Strukturní vzorec fenylefrinu. Zdroj: ČL2009, str. 2911.

Chemický název: (1*R*)-1-(3-hydroxyfenyl)-2-(methylamino)ethan-1-ol (22)
3-[(1*R*)-1-hydroxy-2-(methylamino)ethyl]fenol (IUPAC) (24)

Generický název: Fenylefrin
m-Oxedrin
Fenylefedrin

Sumární vzorec: C₉ H₁₃ N O₂

M_r = 167,21

Krystalický prášek, bílý nebo téměř bílý.

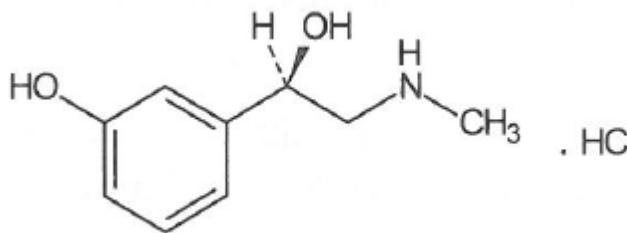
Těžce rozpustný ve vodě a v lihu 96 %, mírně rozpustný v methanolu, rozpustný ve zředěných minerálních kyselinách a ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů.

Teplota tání asi 174 °C.

(22)

Lékopisný název: Phenylephrini hydrochloridum

Strukturní vzorec:



Obr. 4: Strukturní vzorec soli fenylefrinu s HCl. Zdroj: ČL2009, str. 2910.

Chemický název: (1*R*)-1-(3-hydroxyfenyl)-2-(methylamino)ethan-1-ol-
-hydrochlorid

Generický název: Fenylefrin-hydrochlorid

Sumární vzorec: C₉ H₁₄ Cl N O₂

$M_r = 203,67$

Krystalický prášek, bílý nebo téměř bílý.

Snadno rozpustný ve vodě a v ethanolu 96 %.

Teplota tání asi 143 °C.

(22)

FARMAKOLOGICKÉ VLASTNOSTI

Farmakodynamika: Fenylefrin se v léčivých přípravcích pro lokální či systémové podání používá převážně ve formě soli s kyselinou chlorovodíkovou. Je to derivát fenylethanolaminu s převážně přímým sympatomimetickým účinkem. Jako agonista α_1 -adrenergních receptorů způsobuje vazokonstrikci, využívá se hlavně jeho antikongestivního účinku na spojivky a na sliznice nosních dutin. Stimulací α_1 -receptorů v m. dilatator pupillae navozuje mydriázu. Při parenterální aplikaci dochází k rychlému zvýšení periferního cévního odporu. Ve vyšších koncentracích může mít fenylefrin také β_1 -mimetický účinek a stimulovat tak činnost srdce.

Farmakokinetika: Po perorálním podání podléhá first pass metabolismu ve střevní stěně a v játrech, biologická dostupnost je proto poměrně nízká, s vysokou inter- i intraindividuální variabilitou. K systémové absorpci dochází i při lokální aplikaci fenylefrinu. Biotransformace probíhá oxidativní deaminací monoaminoxidázou a konjugací s kyselinou sírovou, v menší míře také s kyselinou glukuronovou. Konjugáty jsou vylučovány močí. (2) (31)

KLINICKÉ ÚDAJE

Indikace: Fenylefrin se užívá k dekonesci sliznice při akutních rinitidách různé etiologie, rinofaryngitidách, sinusitidách a zánětech Eustachovy trubice nebo středního ucha. Aplikuje se lokálně ve formě nosních kapek, spreje či gelu nebo perorálně. Další indikace má v oftalmologii, jeho mydriatický účinek se uplatňuje v diagnostice nebo před chirurgickými zákroky, lokální vazokonstrikce je využívána také v terapii hyperemie spojivek či episklerálních cév různého původu. (28)

Vazokonstrikce může být využita také v topických či rektálních přípravcích pro léčbu hemoroidů nebo v injekcích a infuzích v anesteziologii a terapii hypotenze. V ČR nejsou lékové formy pro tyto indikace dostupné. (31)

Dávkování: Fenylefrin-hydrochlorid pro perorální podání je užíván jako vedlejší účinná složka kombinovaných pevných lékových forem (tablety nebo prášek či granulát pro přípravu perorálního roztoku nebo suspenze), jeho množství v jedné dávce přípravku je obvykle 5-15 mg. Dávkování je u jednotlivých přípravků stanoveno s ohledem na hlavní účinnou obsahovou látku, délka léčby by neměla překročit 10 dní.

U nasálních léčivých přípravků se užívá příslušná dávka (dle lékové formy) 3-5x denně a vždy nejdéle po dobu 7 dní, u dětí 5 dní.

V oftalmologii se fenylefrin používá ve formě očních kapek v koncentracích 0,06-10,0 %. (32) Pro vyvolání mydriázy je nutné aplikovat roztok s koncentrací fenylefrinu minimálně 2,5 %, k vazokonstrikci stačí méně koncentrované roztoky. Dávkování a maximální povolená délka terapie bez přerušení jsou stanoveny podle obsahu fenylefrinu a indikace kapek. (28)

Kontraindikace: Perorální podání je kontraindikováno při přecitlivělosti na fenylefrin, při závažné hypertenzi, u glaukomu s uzavřeným úhlem, u dětí

do 6 let, těhotných a kojících. Opatrnost je nutná u diabetitu, hypertyreózy a hypertenze, u nemocí srdce a cév, při hypertrofii prostaty, feochromocytomu a asthma bronchiale.

Absolutními kontraindikacemi pro nasální a oční aplikaci jsou rhinitis a keratoconjunctivitis sicca. Při lokální aplikaci je nutné zvážit i riziko systémových účinků, u jednotlivých léčivých přípravků se omezení liší podle závažnosti rizika s ohledem na místo aplikace a koncentraci fenylefrinu. (2) (28) (32) (33)

Lékové interakce: Fenylefrin je kontraindikován během léčby inhibitory MAO a dva týdny po jejím ukončení. Při užití spolu s tricyklickými či tetracyklickými antidepresivy, guanetidinem a betablokátory dochází ke zvýšení nežádoucích účinků fenylefrinu (riziko hypertenzní krize). Zvýšenou pozornost vyžaduje současné užívání všech léčiv ovlivňujících vegetativní nervový systém a krevní tlak. Při používání nosních dekonstiv se snižuje biologická dostupnost nasálně aplikovaných léčiv. Při současném podání fenylefrinu a timololu do oka se může snížit adsorpce timololu. (2) (28) (34)

Nežádoucí účinky: Systémové projevy aktivace sympatického nervového systému fenylefrinem (hypertenze, palpitace, třes, nervozita, poruchy spánku, zvýšené pocení, bolest hlavy, závratě aj.) jsou častější po perorálním podání, u citlivých jedinců se mohou objevit i po aplikaci lokální. Aplikace očních a nosních přípravků může způsobit přechodné podráždění místa aplikace spojené s pocitem pálení či bolesti. Při zvýšené citlivosti, předávkování nebo delším podávání lokálních dekonstiv hrozí vznik rebound fenoménu (reaktivní hyperemie) a poškození epitelu sliznic či spojivek (suchost, krvácení). (28)

Toxicita: Typické systémové projevy při předávkování fenylefrinem jsou zvýšený krevní tlak, bolest hlavy, palpitace, nervozita, tremor a vomitus. Počáteční tachykardie bývá nahrazena reflexní bradykardií. K závažné intoxikaci dochází nejčastěji perorální cestou, terapie se v tomto případě zahajuje podáním aktivního uhlí, někdy laváží žaludku. Ke zmírnění hypertenze se podává v první řadě α -lytický adrenergní vazodilatátor (fentolamin).

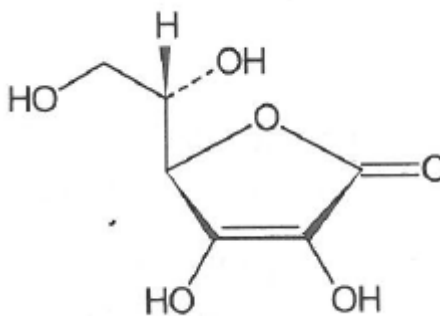
Jestliže se systémové nežádoucí reakce objeví při lokální aplikaci, je vhodné místo aplikace co nejdříve pečlivě opláchnout vodou. U mírné intoxikace bývá léčba pouze symptomatická, důležitá je hydratace organismu a dostatečný přísun kyslíku. V případě potřeby lze podat benzodiazepiny na uklidnění. (31) (32)

2.3.3 Kyselina askorbová

FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÉ VLASTNOSTI

Lékopisný název: Acidum ascorbicum

Strukturní vzorec:



Obr. 5: Strukturní vzorec kyseliny askorbové. Zdroj: ČL2009, str. 1208.

Chemický název:

(5R)-5-[(1S)-1,2-dihydroxyethyl]-3,4-dihydroxyfuran-2(5H)-on (22)

(2R)-2-[(1S)-1,2-dihydroxyethyl]-3,4-dihydroxy-2H-furan-5-on (IUPAC) (24)

γ -lakton *L-threo*-hex-2-enonové kyseliny

4-lakton L-Threo-2,3,4,5,6-pentahydroxy-1-hexenové kyseliny

γ -lakton kyseliny 2-oxo-*L*-(-)gulonové

3-oxo-*L*-gulofuranolakton (31)

Generický název: Kyselina askorbová

Vitamin C

L-Askorbát

E300

Sumární vzorec: $C_6H_8O_6$

$M_r = 176,13$

Bezbarvé krystaly nebo krystalický prášek, bílý nebo téměř bílý, snadno mění barvu vlivem vlhkosti, vzduchu.

Rozpustná snadno ve vodě, dobře v lihu 96 %.

Teplota tání asi 190 °C. (22)

FARMAKOLOGICKÉ VLASTNOSTI

Farmakodynamika: Kyselina L-askorbová je pro člověka esenciální vitamin, v lidském těle se reverzibilně mění na kyselinu dehydroaskorbovou. Působí tak jako nezbytný kofaktor mnoha enzymových systémů (oxidačně-redukčních, hydroxylačných, amidačních aj.). Silné redukční účinky vitaminu C jsou zachovány i v kyselém prostředí. Například v žaludku tak může ovlivnit vstřebávání některých léčiv. Je nezbytný při biosyntéze kolagenu, karnitinu, steroidů a katecholaminů, dále při metabolismu tryptofanu a serotoninu nebo při odbourávání tyrosinu. Slouží jako kofaktor při α -amidaci peptidů, redukci glutathionu nebo při regeneraci tetrahydrofolátu a α -tokoferolu.

Antioxidační účinky vitaminu C (ve spolupráci s vitaminy A a E) chrání tkáně před poškozením vnitřními i vnějšími oxidanty. Zabraňuje peroxidaci lipidů a vychytává kyslíkové radikály, které se podílí na vzniku aterosklerózy a účastní se také při katabolismu cholesterolu. Blokuje také radikály vzniklé při vystavení organismu záření nebo inhalaci cigaretového kouře. Předmětem výzkumu jsou cytotoxické účinky kyseliny askorbové na rakovinné buňky a snížení koncentrace karcinogenních látek v gastrointestinálním traktu při její perorální aplikaci.

Kyselina askorbová zvyšuje odolnost organismu vůči infekcím, zlepšuje reakce imunitního systému a svými antioxidačními účinky podporuje hojení fraktur i ran. Redukcí a chelatací iontů kyselinou askorbovou se zvyšuje resorpce železa. Absorpce hořčíku je rovněž zvýšena současným podáváním vitamínu C. (35) (36)

Farmakokinetika: K resorpci kyseliny askorbové dochází v proximální části tenkého střeva. Biologická dostupnost je závislá na koncentraci v plazmě a snižuje se s rostoucí jednotlivou dávkou. Při doporučeném denním příjmu se plazmatická koncentrace u zdravého člověka pohybuje kolem 0,8 mg/dl. Celkový tělesný obsah vitamínu C bývá 1,5 g. Distribuuje se do všech tkání, prochází přes placentu a do mateřského mléka. Kumuluje se v hypofýze, leukocytech, nadledvinách a očních čočkách. Denní obrat činí přibližně 1 mg/kg tělesné hmotnosti. Metabolismus kyseliny askorbové probíhá přeměnou na oxalát, méně také sulfát nebo konjugát kyseliny askorbové s β -D-glukuronovou. Metabolity jsou eliminovány močí. Při zvýšeném příjmu se plazmatická koncentrace zpočátku lineárně zvyšuje, po přesažení hodnoty renálního prahu (asi 1,5 mg/dl) však dochází k eliminaci kyseliny askorbové v nezměněné formě močí. (35) (36)

KLINICKÉ ÚDAJE

Indikace: Prevence a léčba nedostatku vitamínu C. Potřeba kyseliny askorbové se liší podle věku. Vyrůstá při zvýšené psychické nebo fyzické zátěži, po úraze či operaci a během infekčních onemocnění (obzvláště při jejich nástupu nebo při horečce) a v období rekonvalescence. Deficit vzniká také při dlouhodobém působení chladu či při popáleninách a u jiných špatně se hojících ran. Chronické choroby (například hypercholesterolemie, hypertyreóza, ledvinná nedostatečnost nebo nádorová onemocnění), ale také kouření a alkoholismus zvyšují spotřebu vitamínu C v těle. Nároky na přísun kyseliny askorbové u zdravého člověka rostou v těhotenství a při kojení, v období rychlého růstu, během dospívání, při sportu a ve vysokém věku.

Vitamín C je profylakticky podáván pro zvýšení odolnosti organismu k vnějším stresovým faktorům (záření, infekce, volné radikály). Běžně dostupné jsou perorální léčivé formy s různě velkým obsahem a způsobem použití. Používají se též injekční nebo infuzní roztoky kyseliny askorbové terapeuticky například při léčbě methemoglobinémie v dětském věku nebo jako substituce vitamínu C při totální parenterální výživě, při poruchách příjmu potravy, onemocněních GIT. (28) (37) (35) (36)

Dávkování: Denní potřeba u zdravých jedinců je závislá na věku. U dětí je 30 mg do 6 měsíců, 35 mg do 1 roku, 40 mg do 3 let, 45 mg do 10 let, 50 mg do 15 let, mladiství a dospělí 60 mg. U žen se dále zvyšuje v graviditě (na 70 mg) a při laktaci (na 95 mg).

Profylakticky se kyselina askorbová dlouhodobě podává v dávkách maximálně 150 mg denně (dospělí užívají obvykle 100 mg a děti mladší než 6 let 50 mg). Terapeutické denní dávky kyseliny askorbové se pohybují od 250 mg do 1 g (p.o. nebo i.v. aplikace), léčba obvykle trvá 1-2 týdny. Dlouhodobou léčbu vysokými dávkami není vhodné náhle ukončit, je potřeba postupně snižovat dávky. (28)

Kontraindikace: Přecitlivělost na kyselinu askorbovou. Podání kyseliny askorbové je také nevhodné při porušeném metabolismu železa (například u hemochromatózy či sideroplastické anémie) a při oxalátové urolitiáze. Opatrnost je nutná při jakékoliv insuficienci ledvin, u pacientů se sklony k nefrolitiáze či

s oxalátovou urolitiázou v anamnéze. Při deficitu glukoso-6-fosfátdehydrogenázy může po parenterálním podání dojít k hemolýze.

Lékové interakce: Kyselina askorbová ovlivňuje metabolismus mnoha látek. Zvyšuje absorpci penicilinu V, železa a vitamínu B₁₂ z GITu. Zvyšuje také resorpci a plazmatické hladiny etinylestradiolu. Biologická dostupnost vitamínu C je snížena při podání s kyselinou acetylsalicylovou, jejíž eliminaci snižuje. Současné podání deferoxaminu může zvýšit toxické působení železa na tkáň, především srdce. Kyselina askorbová zvyšuje riziko vzniku krystalurie při terapii sulfonamidy. Snižuje účinky antikoagulantů (warfarin) a heparinu, snižuje plazmatickou koncentraci flufenazinu. Při podávání disulfiramu může pacient reagovat na vysoké dávky kyseliny askorbové obdobně jako na podání alkoholu. Vitamín C ve vysoké koncentraci zkresluje výsledky mnoha laboratorních vyšetření (například stanovení hladiny kyseliny močové v plazmě, kreatinin či glykémie), stanovení diagnózy tak činí obtížnějším.

Nežádoucí účinky: V doporučených dávkách dobrá snášenlivost. Vysoké dávky (> 1 g) mohou vyvolat gastrointestinální obtíže (nauzea, abdominální bolesti, diarrhoea, zvracení), bolesti hlavy a polyurii. Nadbytek kyseliny askorbové je tak vyloučen močí. Vzácně se může objevit reakce přecitlivělosti jako ekzém, kopřivka, astmatický záchvat. Dlouhodobé podávání vysokých dávek pak vede ke vzniku hyperoxalurie, oxalátové nefrolitiázy až oxalózy. Po dlouhodobém podávání vyšších dávek hrozí při vysazení vznik rebound fenoménu s příznaky hypovitaminózy C (skorbut) a poklesem nespecifické imunity, kterému lze ovšem předejít postupným snižováním dávek. Stejný problém se může vyskytnout u novorozenců matek, které užívaly vysoké dávky vitamínu C v těhotenství.

(28) (31) (35) (36) (37)

2.4 ANALÝZA V ODBORNÉ LITERATUŘE

Pro separaci a analýzu různých kombinací paracetamolu, fenylefrinu a kyseliny askorbové byly vyvinuty různé postupy. Uvedeny zde budou metodiky využívající kapalinové chromatografie, které byly publikovány v odborné literatuře v posledních letech.

**Gil-Agustí, M. – Capella-Peiró, E. – Monferrer-Pons, L. –
García-Alvarez-Coque, M. C. – Esteve-Romero, J.; 2001**

Analýza fenylefrinu a dalších fenylethylaminů a antihistaminik ve směsích kapalinovou chromatografií na RP chemicky vázaných C8, C18 a kyano při použití micelárních roztoků dodecylsulfátu sodného (SDS) a pentanolu jako MP za spektrofotometrické UV detekce. Výběr nejvhodnějších fází a podmínek separace proběhl při současné analýze s paracetamolem, kyselinou askorbovou a dalšími látkami obsaženými v kombinovaných léčivých přípravcích na kašel a nachlazení – nebyly pozorovány žádné rušivé vlivy. Na koloně C8 byl nejvhodnější mobilní fází neutrální roztok o složení 0,05M SDS – 6 % (V/V) pentanol nebo 0,15M SDS - 2% (V/V) pentanol. (38)

**Gil-Agustí, M. – Monferrer-Pons, L. – García-Alvarez-Coque, M. C. –
Esteve-Romero, J.; 2001**

Analýza kombinací léčivých látek obsažených v přípravcích indikovaných na rýmu a kašel (antihistaminik chlorfenaminu a dexchlorfenaminu; fenylethylaminů fenylefrinu, fenylpropanol-aminu a pseudoefedrinu). Separace na koloně C18, MP micelární roztoky SDS v pentanolu, detekce UV. Separace probíhala do 7 minut při použití neutrálního roztoku o složení 0,15M SDS – 6 % (V/V) pentanol. Hodnocena opakovatelnost a mezilehlá přesnost. Stanovení obsahu bylo provedeno u 14 komerčních přípravků. Jako referenční MP zvolen vodný 60% (V/V) roztok methanolu. Nebyla zjištěna interference s dalšími obsaženými léčivy (mj. kyselina askorbová a paracetamol). Při konvenční RP-HPLC analýze těchto kombinací byla pro eluci nutná velká spotřeba

methanolu, výhodou micelární chromatografie je snížená spotřeba méně toxického organického rozpouštědla. (39)

Pirol, O. – Sukuroglu, M. – Ozden, T.; 2011

Vývoj a validace HPLC metody pro simultánní stanovení paracetamolu a fenylefrinu-hydrochloridu v kombinovaném LP s oxolamin-citrátem a chlorfeniramin-maleátem. Kolona Agilent Zorbax SB-CN; MP 0,02M roztok fosfátového pufru (pH 4) a acetonitrilu 85 : 15 (V/V); teplota 22 °C; průtok 1,5 ml.min⁻¹. Doba analýzy 3,5 min. (40)

Doua, M. – Gibala, P.; 2010

Vývin a validace metody iontově párové chromatografie pro hodnocení kombinovaných LP s fenylefrinem, které obsahují velká množství paracetamolu a kyseliny askorbové a další příměši. Kolona XTerra RP18 (3 µm, 50 x 3.0 mm id). MP směs acetonitrilu a pufru (oktan-1-sulfonát sodný 10 mM upraven přidavkem kyseliny fosforečné na pH 2,2) 80 : 20 (V/V); konstantní průtok 0,3 ml.min⁻¹; 30 °C; nástřik 3 µl. Fluorescenční detekce v rozmezí 275 – 310 nm. Alternativní metoda chromatografie hydrofilních interakcí: kolona Luna HILIC (3µm, 100 mm x 4,6 mm id); 25 °C; 0,8 ml.min⁻¹, MP složení acetonitril : pufr (75 : 25, V/V) a pH 2,5 (úprava pomocí H₃PO₄); nástřik 5 µl. Hodnoceny sáčky s obsahem komerčního LP. Navrhovaná metoda se ukázala být rychlejší a příprava vzorků snadnější. (41)

Koblová, P. – Sklenářová, H. – Brabcová, I. – Solich, P.; 2012

Vývoj a validace jednoduché chromatografické metody pro rychlé stanovení kyseliny askorbové, fenylefrinu, paracetamolu a kofeinu izokratickou elucí. Použita byla monolitická kolona Onyx Monolithic C18 (100 x 4,6 mm), MP acetonitril a fosforečnanový pufr (10 : 90, V/V), pH 6,5; průtok 1,0 ml.min⁻¹, 25 °C, nástřik 10 µl. Jako vnitřní standard byla zvolena kyselina salicylová. Detekce při dvou vlnových délkách 210 nm (fenylefrin, paracetamol a IS) a 235 nm (kyselina askorbová a kofein). Metoda byla použita pro stanovení obsahu látek v LP Coldrex tbl. (Smithkline Beecham Consumer Healthcare, UK). (42)

**Sklenářová, H. – Chocholouš, P. – Kobllová, P. – Zahálka, L. –
Šatínský, D. – Matysová, L. – Solich, P.; 2013**

Srovnání separace kyseliny askorbové, paracetamolu a kofeinu na třech typech monolitických kolon: OnyxTM monolithic C18 (100 x 4,6 mm; Phenomenex), Chromolith[®] Performance RP-18e (100 x 3 mm; Merck) a nejnovější Chromolith[®] HighResolution RP-18e (100 x 4,6 mm; Merck). Hodnocené parametry: účinnost, pracovní tlak, faktor symetrie píku a rozlišení. Izokratická eluce. MP acetonitril a kyselina fosforečná 10 : 90 (V/V) pH 2,8. (43)

Şenyuva, H. – Özden, T.; 2002

Byla popsána rychlá a přesná HPLC metoda pro současnou analýzu paracetamolu, hydrochloridu fenylefrinu a chlorfeniraminu maleátu v kombinovaných léčivých přípravcích. Kolona µBondapak CN RP (125 Å, 10 µm; 3.9 × 150 mm). 22 °C. MP acetonitril a fosforečnanový pufr 78 : 22 (V/V); pH 6,22. Při použití metody pro hodnocení dětských sirupů, tablet a kapslí užívaných v Turecku při nachlazení byla naměřena relativní směrodatná odchylka (10 opakování) do 2 %. (44)

Gioia, M. G. – Andreatta, P. – Boschetti, S. – Gatti, R.; 2008

Vývoj a validace iontově párové RP-HPLC metody pro stanovení kyseliny dehydroaskorbové, askorbové a acetaminofenu. Kyselinu dehydroaskorbovou je nutno před analýzou derivatizovat. Kolona Phenomenex Synergi 4u hydro-RP, 150 x 4,6 mm. Izokratická eluce. Reagent v MP cetyltrimethylammonium-bromid. Hodnocení LOD, LOQ a dalších parametrů. (45)

Marín, A. – García, E. – García, A. – Barbas, C.; 2002

Vývoj a validace metody pro stanovení acetaminofenu, fenylefrinu a chlorfeniraminu v kombinovaných LF (kapsle, sáčky). Testována byla také selektivita metody nahrazením fenylefrinu fenylpropanolaminem. Gradientová eluce. MP směs dvou rozpouštědel, mění se poměr A : B. A: fosforečnanový pufr 40 mM při pH 6,0. B: acetonitril. Detekce UV při 250 nm fenylefrin a chlorfeniramin a při 280 nm acetaminofen. (46)

**Dewani, A. P. – Barik, B. B. – Chipade, V. D. – Bakal, R. L. –
Chandewar, A. V. – Kanungo, S. K.; 2012**

Vývoj jednoduché specifické izokratické metody RP-HPLC-DAD pro simultánní analýzu fenylefrinu, paracetamolu, kofeinu a chlorfeniraminu. Kolona C-18 (150 x 4,5 mm id, částice velikosti 5µm). MP směs acetonitrilu, methanolu a 10mM fosforečnanového pufru (okys. H₃PO₄ na pH = 2,5 ± 0,02) v poměru 16 : 22 : 62 (V/V); průtok 1,0 ml.min⁻¹. Detekce DAD, 280 nm. Eluce všech analytů do 11 min. Metoda byla na základě hodnocení linearit, rozsahu, specifity, správnosti, přesnosti a robustnosti validována a úspěšně použita pro hodnocení kombinovaného LP ve formě tablet. (47)

**Deconinck, E. – Sacre, P. Y. – Baudewyns, S. – Courselle, P. –
De Beer, J. ; 2011**

Byla vyvinuta a validována UHPLC metoda pro identifikaci a stanovení obsahu LP obsahujících paracetamol a/nebo acetylsalicylovou kyselinu v kombinaci s fenylefrinem, feniraminem maleátem, difenhydraminem nebo prometazinem a/nebo jinými složkami (sulfát chininu, kofein, fosfát kodeinu). Kolona Waters Acquity BEH C18 (2 mm x 100 mm; 1,7 µm). Gradientová eluce. MP pufr octan amonný (pH 4,0) + MeOH. (48)

**García, A. – Rupérez, F. J. – Marín, A. – De la Maza, A. – Barbas, C.;
2003**

Vývoj a validace rychlé HPLC metody pro simultánní analýzu paracetamolu, fenylefrinu a chlorfeniraminu včetně separace nečistot 4-aminofenolu a 4-chloracetanilidu v LP (kapsle). Izokratická eluce. Kolona Supelco Discovery HS PEG 15 x 0,46 cm; 5 µm. MP fosforečnanový pufr (20 mM; pH 7,0) + acetonitril 90 : 10 (V/V); 1 ml.min⁻¹. Detekce UV při 310 nm (paracetamol) a při 215 nm (ostatní látky). (49)

Demiralay, E. Ç. – Gümüştas, M. – Canbay, H.; 2011

Optimalizace poměru organického rozpouštědla v MP pro současnou analýzu paracetamolu a fenylefrinu v tekutých LF používaných pro léčbu rýmy. Kolona

Synergi Polar RP (4 μ m; 150 x 4,6 mm id). MP acetonitril : voda s obsahem 65mM kyseliny fosforečné, 5 : 95 (V/V). (50)

Heydari, R.; 2008

Pro současné stanovení paracetamolu, fenylefrinu, dextrometorfanu a chlorfeniraminu v LF byla vyvinuta HPLC metoda používající silikagelu jako SP, kolona 25 cm. MP methanol + vodný roztok 6,0 g octanu amonného a 10 ml triethylaminu v 1000 ml vody (pH 5,0; upraveno přidavkem kyseliny *o*-fosforečné) v poměru 95 : 5 (V/V). Detekce UV-VIS, 254 nm paracetamol, 220 nm fenylefrin, 227 nm dextrometorfan a chlorferinamin. Eluce všech analytů do 12 min. (51)

Olmo, B. – García, A. – Marín, A. – Barbas, C.; 2005

Porovnání použití dvou kyanopropylových SP pro hodnocení LP (sáčky) s obsahem paracetamolu, fenylefrinu-hydrochloridu a chlorfeniraminu-maleátu.

a) Kolona Discovery (SUPELCO), MP poměr vodného a organického rozpouštědla (95 : 5), gradient pH (7,5 – 2), doba analýzy 14 min.

b) Kolona Agilent Zorbax SB-CN, izokratická eluce účinných i pomocných látek v LF do 30 min, kromě toho také separace dalších příbuzných látek, validace metody. Využití pro hodnocení stability přípravku. (52)

Thomis, R. – Roets, E. – Hoogmartens, J.; 1984

Jedna ze starších prací popisuje RP-HPLC metodu pro stanovení obsahu látek a hlavních nečistot v šumivých tabletách obsahujících paracetamol, kyselinu acetylsalicylovou a askorbovou na koloně C8. Hodnocení stability přípravku a popis hlavních rozkladných produktů. Jako MP použita směs MeOH, 0,2M fosforečnanového pufru (pH 3,5) a vody v poměru 20 : 10 : 70. (53)

Bastos, C. D. A. – de Oliveira, M. A.; 2009

Validace metody iontově párové RP-HPLC pro analýzu paracetamolu, fenylefrinu a karbinoxaminu v tabletách. Kolona C18 (5 μ m; 300 mm; 3,9 mm), MP směs o složení 60 % MeOH, 40 % vodného roztoku dihydrogenfosforečnanu draselného (62,46 mmol.l⁻¹) s přidavkem kyseliny fosforečné (1 ml), triethylaminu (0,5 ml)

a laurylsíranu sodného (0,25 g). UV detekce při 220 nm fenylefrin a karbinoxamin, při 300 nm paracetamol. Izokratická eluce do 5 min. (54)

Akay, C. – Değim, İ. T. – Sayal, A. – Aydin, A. – ÖZKAN, Y. – Gül, H.; 2009

Popsána rychlá RP-HPLC metoda pro současnou analýzu LP s obsahem paracetamolu, kyseliny acetylsalicylové a askorbové. Použita pro kvantifikaci obsahových látek a současně i rozkladných produktů, nečistot. Kolona Bondapak C18 RP. MP: MeOH a H₂O (35 : 65; V/V) pH 3,1 (upraveno přidáním 10% kyseliny *o*-fosforečné). Průtok 1,8 ml.min⁻¹. Detekce UV 235 nm. IS: sulfamethoxazol. (55)

Šatínský, D. – Neto, I. – Solich, P. – Sklenářová, H. – Conceicao, M. – Montenegro, B. S. M. – Araujo, A. N.; 2004

Vývoj nové separační metody pro simultánní stanovení paracetamolu, kofeinu a acetylsalicylové kyseliny a IS benzoové kyseliny - sekvenční injekční chromatografie na RP s detekcí UV. Metoda je použitelná pro analýzu tablet s obsahem paracetamolu, kofeinu a kyseliny acetylsalicylové. (56)

Šatínský, D. – Brabcová, I. – Maroušková, A. – Chocholouš, P. – Solich, P.; 2013

Vývoj a validace HPLC metody pro separaci 4 sloučenin s odlišnými fyzikálně chemickými vlastnostmi (4-aminofenol, kofein, paracetamol, propyfenazon). Metoda je jednoduchá, rychlá a šetrná k životnímu prostředí. MP vodná s obsahem 0,04 % triethylaminu. SP polyethylenglykolová RP, kolona Supelco Discovery HS PEG (15 x 4 mm), velikost částic 3 μm. IS kyselina benzoová. Teplota 30 °C. Průtok 1,0 ml.min⁻¹. Izokratická eluce. UV detekce při 210 nm. Použito na stanovení obsahu látek u komerčního LP. Studovány možnosti použití PEG stacionární fáze pro separaci sloučenin, které jsou dosavadními metodami těžko separovatelné vlivem jejich odlišností ve fyzikálně chemických vlastnostech. (57)

3 CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo vypracovat postup pro současnou analýzu paracetamolu, kyseliny askorbové a fenylefrinu v léčivém přípravku s využitím HPLC. Bylo třeba nalézt chromatografické podmínky pro analýzu látek s ohledem na poměr množství, v jakém jsou v LP obsaženy. Další snahou bylo optimalizovat přípravu vzorků i nalezené chromatografické podmínky separace a připravit podklady pro stanovení obsahu látek v LP, nalézt vnitřní standard a vytvořit kalibrační závislost.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 POMŮCKY, PŘÍSTROJE, MATERIÁL, CHEMIKÁLIE

PŘÍSTROJE A JINÉ POMŮCKY:

Kapalinový chromatograf Hewlett Packard series 1100, HPST s. r. o. Praha, ČR

Spektrofotometr Shimadzu UV-2401 PC, Japonsko

pH metr Acidimetr 333, Druopta Praha, ČR

Analytické váhy KERN ALS-220-4N, Balingen, Německo

Ultrazvuková lázeň K10, Kraitex s. r. o, Slovensko

Centrifuga IEC CL31R Multispeed, Thermo Electron Corporation, Francie

Laboratorní sklo

Filtrační papír

Lžičky

Gumové hadice

CHROMATOGRAFICKÝ MATERIÁL:

Kolona Macherey-Nagel; náplň NUCLEOSIL C18; délka 150 mm; 4 mm id; velikost zrn 5 μm .

CHEMIKÁLIE:

Acetanilid, Léčiva Praha, ČR

Acetonitril pro chromatografii, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo

Allopurinol, Léčiva Praha, ČR

Benetazon, Léčiva Praha, ČR

Dihydrogenfosforečnan draselný, Lachema Brno, ČR

Dihydrogenfosforečnan sodný, Lachema Brno, ČR

Ethylparaben, Fluka, Německo

Fenacetin, Léčiva Praha, ČR

Fenylefrin, Léčiva Praha, ČR

Fosforečnan amonný, Lachema Brno, ČR

Glibenklamid, Léčiva Praha, ČR
Hydrochlorothiazid, Léčiva Praha, ČR
Chloramfenikol, Galenická laboratoř OSTRAVA, ČR
Ibuprofen, Léčiva Praha, ČR
Isoprenalin, Léčiva Praha, ČR
Jodid draselný, Lachema Brno, ČR
Kyselina acetylsalicylová, Balex, Pardubice – Rosice n. L.
Kyselina askorbová, Léčiva Praha, ČR
Kyselina fosforečná 50%, PENTA Chrudim, ČR
Kyselina octová, PENTA Chrudim, ČR
Methanol pro chromatografii, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo
Methanol, PENTA Chrudim, ČR
Methylparaben, Fluka, Německo
Octan amonný, Balex, Pardubice – Rosice n. L., ČR
Paracetamol, Léčiva Praha, ČR
Propylparaben, Fluka, Německo
Sulfafurazol, Léčiva Praha, ČR
Voda čištěná reverzní osmózou

HODNOCENÝ LP:

Coldrex Junior - prášek pro přípravu perorálního roztoku (3 g)

Účinné látky: paracetamol (300 mg), fenylefrin-hydrochlorid (5 mg), kyselina askorbová (20 mg).

Pomocné látky: sacharóza, kyselina citronová, dihydrát citronanu sodného, sodná sůl sacharinu, sušený kukuřičný škrob, citronové aroma, natrium-cyclamát, barvivo kurkumin (E100), koloidní bezvodý oxid křemičitý. (2)

4.2 PRACOVNÍ POSTUP

Vypracování chromatografických podmínek pro současnou analýzu paracetamolu, fenylefrinu a kyseliny askorbové zahrnovalo výběr stacionární fáze, výběr a optimalizace složení mobilní fáze, zvolení vhodné vlnové délky detekce a výběr vnitřního standardu. Také bylo nutné optimalizovat vnější podmínky separace jako jsou teplota, pH a průtoková rychlost mobilní fáze.

Následovala příprava dalších podmínek pro stanovení obsahu látek v léčivém přípravku, zahrnující optimalizaci přípravy vzorků a vypracování kalibrační závislosti pro stanovení obsahu.

4.2.1 Výběr fází, vlnové délky a podmínek separace

SP: Kolona Macherey-Nagel s náplní NUCLEOSIL C18 (150 x 4 mm id; 5 μ m).

MP1: Methanol – voda (60 : 40); průtok 0,7 ml.min⁻¹; nástřik 10 μ l; 254 nm;
Teploty 25 °C a 40 °C.

MP2: Acetonitril – voda (60 : 40); průtok 0,7 ml.min⁻¹; nástřik 10 μ l; 254 nm;
Teploty 25 °C a 40 °C.

MP3: Acetonitril – voda (60 : 40); okyselení kyselinou fosforečnou na pH 2,78;
25 °C, průtok 0,7 ml.min⁻¹; nástřik 10 μ l;
Zkoušené nastavení vlnové délky detektoru na 254 nm, 315 nm, 210 nm.

Proměření absorpčních spekter standardů.

Nastavení vlnové délky na 270 nm.

MP4: Methanol – 0,01M vodný roztok dihydrogenfosforečnanu draselného (60 : 40); 25 °C, průtok 0,7 ml.min⁻¹; nástřik 10 μ l; 270 nm.

MP5: Methanol – 0,01M vodný roztok dihydrogenfosforečnanu draselného (60 : 40), okyselení kyselinou fosforečnou na pH 3,67; 25 °C, průtok 0,7 ml.min⁻¹; nástřik 10 μ l; 270 nm.

MP6: Methanol – 0,01M vodný roztok dihydrogenfosforečnanu draselného (40 : 60), okyselení kyselinou fosforečnou na pH 3,28; 25 °C, 10 μ l; 270 nm.
Průtokové rychlosti 0,7 ml.min⁻¹; 0,5 ml.min⁻¹.

MP7: Methanol – 0,05M vodný roztok octanu amonného (50 : 50); okyselení kyselinou octovou; 25 °C, průtoková rychlost 0,7 ml.min⁻¹; nástřik 10 µl; 270 nm. Zkoušené hodnoty pH 6,08; pH 4,21 a pH 3,46.

MP8: Methanol – 0,05M vodný roztok octanu amonného (30 : 70); okyselení kyselinou octovou na pH 3,45; 25 °C, průtok 0,7 ml.min⁻¹; nástřik 10 µl; Vlnové délky 270 nm, 225 nm.

MP9: Methanol – 0,01M vodný roztok dihydrogenfosforečnanu draselného (30 : 70), okyselení kyselinou fosforečnou na pH 3,00; 25 °C, nástřik 10 µl; Vlnové délky 270 nm, 225 nm. Rychlosti průtoku 0,7 ml.min⁻¹ a 0,5 ml.min⁻¹.

MP10: Methanol – 0,01M vodný roztok dihydrogenfosforečnanu draselného (20 : 80), okyselení kyselinou fosforečnou na pH 3; 25 °C, průtok 0,7 ml.min⁻¹; nástřik 10 µl; 225 nm.

MP11: Methanol – 0,05M vodný roztok dihydrogenfosforečnanu draselného (20 : 80), okyselení kyselinou fosforečnou na pH 3; 25 °C, průtoková rychlost 0,7 ml.min⁻¹; nástřik 10 µl; 225 nm.

MP12: Methanol – 0,001M vodný roztok dihydrogenfosforečnanu draselného (20 : 80), okyselení kyselinou fosforečnou na pH 3; nástřik 10 µl; 225 nm.

Průtokové rychlosti 0,8 ml.min⁻¹ a 0,5 ml.min⁻¹ a 0,7 ml.min⁻¹.

Teploty 23 °C a 25 °C.

Nástřik vzorků rozpuštěných v methanolu. Nástřik vzorků rozpuštěných v H₂O.

4.2.2 Výběr vnitřního standardu

Po optimalizaci složení MP následoval výběr vhodného vnitřního standardu. Použita byla mobilní fáze se složením MP12 (viz 4.2.1) při teplotě 25 °C a průtoku 0,7 ml.min⁻¹, detekce UV při 225 nm.

Vzorky potenciálních vnitřních standardů byly připraveny rozpuštěním zkoušených látek v methanolu a nastříknuty na kolonu (objem 10 µl). Naměřené retenční časy látek byly porovnány s retenčními časy vzorků standardů analytů, získanými za stejných podmínek. Ověření vhodnosti IS proběhlo současnou analýzou vybrané látky se standardy paracetamolu, fenylefrinu a kyseliny askorbové (příprava a nástřik směsi standardů s vybraným IS).

Testovány byly následující látky:

Methylparaben	Ethylparaben	Kyselina acetylsalicylová
Hydrochlorothiazid	Acetanilid	Fenacetin
Chloramfenikol	<u>Allopurinol</u>	Sulfafurazol
Benetazon	Ibuprofen	Glibenklamid
Isoprenalin.		

Příprava vzorků rozpuštěním látek v methanolu s použitím ultrazvukové lázně a následným dalším zředěním roztoků. Nástřik a porovnání retenčních časů těchto látek s retenčními časy standardů analytů, získanými za stejných podmínek. Ověření vhodnosti IS současnou analýzou vybrané látky se standardy paracetamolu, fenylefrinu a kyseliny askorbové (příprava a nástřik směsi standardů s vybraným IS).

4.2.3 Příprava MP, zásobních roztoků a roztoků vzorků

Výpočty všech uvedených navážek byly provedeny s využitím přímo úměrných vztahů a znalosti definice 1M roztoku a relativní molekulové hmotnosti látek.
 $M_r(\text{KH}_2\text{PO}_4) = 136,06$

Příprava MP

Jako mobilní fáze byla vybrána směs methanolu a vodného roztoku KH_2PO_4 ($c = 0,001 \text{ mol.l}^{-1}$) v poměru 20 : 80, okyselená 50% kyselinou fosforečnou na pH 3 (MP12, viz 4.2.1). Nejprve byl připraven roztok dihydrogenfosforečnanu draselného rozpuštěním navážky 0,1361 g KH_2PO_4 v 1000 ml ultračisté vody v odměrné baňce. Roztok byl zfiltrován s vodní vývěvou přes filtr ze slinutého skla. K 560 ml tohoto roztoku bylo přidáno 140 ml methanolu pro chromatografii, výsledná směs byla okyselená 50% kyselinou fosforečnou na hodnotu pH 3,00.

Příprava zásobních roztoků

Zásobní roztoky byly připraveny navážením standardů látek a jejich rozpuštěním v 10 ml methanolu v odměrné baňce. Pro dokonalé rozpuštění látek byly roztoky ponořeny na 2 minuty do ultrazvukové lázně.

Zp: zásobní roztok standardu paracetamolu ($c_P = 2 \text{ mg.ml}^{-1}$): navážka P 0,0202 g.

Z_A: zás. roztok standardu kys. askorbové ($c_A = 1 \text{ mg.ml}^{-1}$): navážka A 0,0100 g.

Z_F: zásobní roztok standardu fenylefrinu ($c_F = 1 \text{ mg.ml}^{-1}$): navážka F 0,0099 g.

Příprava roztoků vzorků

Roztoky vzorků byly připraveny ze zásobních roztoků tak, aby poměr koncentrací jednotlivých analytů odpovídal poměru obsahových látek v LP. (3 g LP obsahují Paracetamolu 300 mg, kyseliny Askorbové 20 mg a Fenylefrinu 5 mg. Pracovalo se s poměrem 50x menším 6 : 0,4 : 0,1.)

Roztok standardu P připraven doplněním methanolu k 3 ml roztoku Z_P (odp. 6 mg paracetamolu) do 5ml odměrné baňky.

Roztok standardu A připraven doplněním methanolu k 0,4 ml roztoku Z_A (odp. 0,4 mg kys. askorbové) do 5ml odměrné baňky.

Roztok standardu F připraven doplněním methanolu k 0,1 ml roztoku Z_F (odp. 0,1 mg fenylefrinu) do 5ml odměrné baňky.

Roztok směsi standardů PAF připraven pipetováním 3 ml Z_P a 0,4 ml Z_A a 0,1 ml Z_F do 5ml odměrné baňky a doplněním methanolu.

Směs PAF s IS

($c_P = 3 \text{ mg.ml}^{-1}$; $c_A = 0,2 \text{ mg.ml}^{-1}$; $c_F = 0,05 \text{ mg.ml}^{-1}$; $c_{IS} = 0,1 \text{ mg.ml}^{-1}$):

4,5 ml roztoku č.1 + 0,5 ml roztoku č. 2.

Roztok č.1 byl připraven navážením a rozpuštěním 300 mg P, 20 mg A a 5 mg F ve 100 ml methanolu (roztok ponořen na 2 minuty do ultrazvukové lázně). Stejný postup byl opakován s navážkou 10 mg allopurinolu za vzniku *roztoku č.2*.

Roztok LP₁ ($c_P = 1,2 \text{ mg.ml}^{-1}$; $c_A = 0,08 \text{ mg.ml}^{-1}$; $c_F = 0,02 \text{ mg.ml}^{-1}$).

Příprava rozpuštěním 1,2 g LP (odp. 120 mg P; 8 mg A; 2 mg F) ve 100 ml v odměrné baňce (přesná navážka LP 1,1964 g). Ponoření na 2 minuty do ultrazvukové lázně a centrifugace po dobu 5 minut 30 vteřin při 5000 otáčkách za teploty 20 °C. Filtrace přes filtrační papír.

Roztok LP₂ ($c_P = 3 \text{ mg.ml}^{-1}$; $c_A = 0,2 \text{ mg.ml}^{-1}$; $c_F = 0,05 \text{ mg.ml}^{-1}$) byl připraven rozpuštěním 1,5 g LP v 50 ml methanolu opět s využitím ultrazvukové lázně i centrifugace. Ten byl dále ředěn

a) stejným množstvím vody za vzniku **roztoku LP₃** s koncentracemi $c_P = 1,5 \text{ mg.ml}^{-1}$; $c_A = 0,1 \text{ mg.ml}^{-1}$; $c_F = 0,025 \text{ mg.ml}^{-1}$;

b) 10x methanolem (1 ml roztoku do 10ml odměrné baňky doplněno methanolem) za vzniku **roztoku LP₄** s konc. $c_P = 0,3 \text{ mg.ml}^{-1}$; $c_A = 0,02 \text{ mg.ml}^{-1}$; $c_F = 0,005 \text{ mg.ml}^{-1}$.

4.2.4 Změny parametrů MP a jejich vliv na analýzu

Byl zjišťován vliv změny koncentrace pufru v MP, změny poměru organické a vodné části MP a změny pH na průběh separace. Nástřik roztoku směsi standardů PAF s IS a také roztoku jodidu draselného (KI) pro zjištění mrtvého retenčního času, popř. vzorky standardů jednotlivě při nejasném přiřazení odezvy k analytu (nejčastěji potíže s identifikací píku fenylefrinu). Detekce UV 225 nm; při 25 °C, průtok 0,7 ml.min⁻¹. Pro tyto účely byly připraveny další mobilní fáze, jejichž složení je zde uvedeno.

0,001M roztok K₂HPO₄ : methanol = 80 : 20, okyseleno 50% H₃PO₄ na pH 3,00

Změny pH mobilní fáze.

0,001M roztok K₂HPO₄ : methanol = 80 : 20, okyseleno 50% H₃PO₄ na pH 3,67

0,001M roztok K₂HPO₄ : methanol = 80 : 20, okyseleno 50% H₃PO₄ na pH 4,01

0,001M roztok K₂HPO₄ : methanol = 80 : 20, okyseleno 50% H₃PO₄ na pH 4,88

0,001M roztok K₂HPO₄ : methanol = 80 : 20, okyseleno 50% H₃PO₄ na pH 5,80

Změny poměru organické složky (methanolu) v MP.

0,001M roztok K₂HPO₄ : methanol = 70 : 30, okyseleno 50% H₃PO₄ na pH 3,00

0,001M roztok K₂HPO₄ : methanol = 60 : 40, okyseleno 50% H₃PO₄ na pH 3,00

0,001M roztok K₂HPO₄ : methanol = 50 : 50, okyseleno 50% H₃PO₄ na pH 3,00

Připraveno 1000 ml zfiltrovaného 0,001M pufru (navážka 0,1366 g K₂HPO₄), který byl mísen s methanolem v uvedených poměrech a výsledná směs okyselená kyselinou fosforečnou.

Změny koncentrace dihydrogenfosforečnanu draselného ve vodné složce MP.

0,005M roztok K_2HPO_4 : methanol = 80 : 20, okyseleno 50% H_3PO_4 na pH 3,00

0,01M roztok K_2HPO_4 : methanol = 80 : 20, okyseleno 50% H_3PO_4 na pH 3,00

0,05M roztok K_2HPO_4 : methanol = 80 : 20, okyseleno 50% H_3PO_4 na pH 3,00

Byly připraveny roztoky s různými koncentracemi dihydrogenfosforečnanu draselného, přefiltrovány a míseny s 50 ml methanolu, výsledné směsi okyseleny kyselinou fosforečnou na pH 3.

0,005M pufr – navážka 0,1367 g rozpuštěna ve 200 ml vody.

0,01M pufr – navážka 0,2724 g na 200 ml vody.

0,05M pufr – navážka 1,3620 g na 200 ml vody.

4.2.5 Kalibrace

Posledním krokem bylo vypracování kalibrační závislosti pro současné stanovení obsahu PAF v LP. Bylo třeba vypracovat 3 kalibrační křivky, pro každou látku zvlášť a v jiném rozmezí koncentrací s ohledem na obsah látek v LP tak, aby bylo možné je zaneść do jednoho grafu. Koncentrace zvolené pro kalibraci se pohybovaly v rozmezí $\pm 50 \%$ předpokládaného obsahu dané látky v LP (150 - 450 mg pro paracetamol, 10 - 30 mg pro kyselinu askorbovou a 2,5 - 7,5 mg pro fenylefrin).

Příprava kalibračních roztoků do 100ml odměrných baněk, rozpuštění navážek P v methanolu za pomoci ultrazvukové lázně. Napipetování příslušných objemů s požadovaným obsahem A ze zásobního roztoku Z_{KA} ($c_A = 10 \text{ mg.ml}^{-1}$) a F ze zásobního roztoku Z_F ($c_F = 1 \text{ mg.ml}^{-1}$).

Příprava Z_{KA} navážením 500 mg A do 50ml odměrné baňky a doplněním methanolem.

Do každého kalibračního roztoku (K1-K5) přidána také přesná navážka 10,0 mg allopurinolu, jeho koncentrace je ve výsledných v kalibračních roztocích stejná. $c_{IS} = 0,1 \text{ mg.ml}^{-1}$. Nakonec je do odměrných baněk doplněn methanol do 100 ml.

Kalibrační roztok K1.

$c_P = 1,5 \text{ mg.ml}^{-1}$; $c_A = 0,1 \text{ mg.ml}^{-1}$; $c_F = 0,025 \text{ mg.ml}^{-1}$

150 mg P + 1 ml Z_{KA} (odp. 10 mg A) + 2,5 ml Z_F (odp. 2,5 mg F) + 10 mg IS.

Kalibrační roztok K2.

$$c_P = 2,5 \text{ mg.ml}^{-1}; c_A = 0,15 \text{ mg.ml}^{-1}; c_F = 0,035 \text{ mg.ml}^{-1}$$

250 mg P + 1,5 ml Z_{KA} (odp. 15 mg A) + 3,5 ml Z_F (odp. 3,5 mg F) + 10 mg IS.

Kalibrační roztok K3.

$$c_P = 3,0 \text{ mg.ml}^{-1}; c_A = 0,2 \text{ mg.ml}^{-1}; c_F = 0,05 \text{ mg.ml}^{-1}$$

300 mg P + 2 ml Z_{KA} (odp. 20 mg A) + 5 ml Z_F (odp. 5 mg F) + 10 mg IS.

Kalibrační roztok K4.

$$c_P = 3,5 \text{ mg.ml}^{-1}; c_A = 0,25 \text{ mg.ml}^{-1}; c_F = 0,065 \text{ mg.ml}^{-1}$$

350 mg P + 2,5 ml Z_{KA} (odp. 25 mg A) + 6,5 ml Z_F (odp. 6,5 mg F) + 10 mg IS.

Kalibrační roztok K5.

$$c_P = 4,5 \text{ mg.ml}^{-1}; c_A = 0,3 \text{ mg.ml}^{-1}; c_F = 0,075 \text{ mg.ml}^{-1}$$

450 mg P + 3 ml Z_{KA} (odp. 30 mg A) + 7,5 ml Z_F (odp. 7,5 mg F) + 10 mg IS.

MP: směs 0,001M roztoku K₂HPO₄ a methanolu v poměru 80 : 20, okyselená 50% H₃PO₄ na pH 3,02.

Nástřik každého kalibračního roztoku byl proveden třikrát a do výpočtu byl vždy použit průměr ze tří měření. Vypočteny poměry velikostí ploch píků standardů k velikosti plochy píku IS. Výsledky zadány do počítače za účelem vytvoření křivek – koncentračních závislostí poměrů ploch jednotlivých látek k ploše IS.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 CHROMATOGRAFICKÉ PODMÍNKY

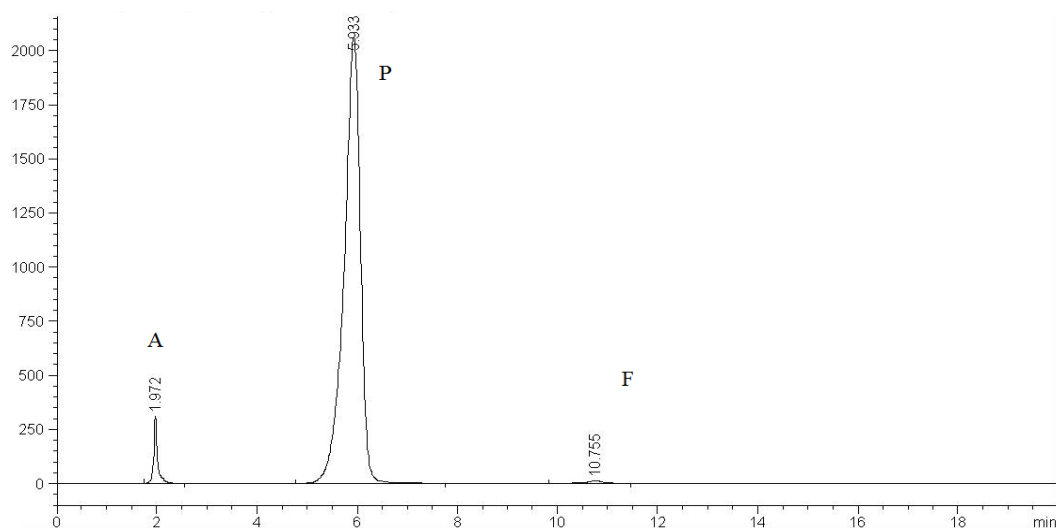
Nejprve bylo nutné vypracovat chromatografické podmínky pro separaci, což znamenalo vybrat stacionární a mobilní fázi, nastavit vlnovou délku detektoru a upravit vnější podmínky tak, aby na chromatografickém záznamu byly patrné dostatečně separované píky paracetamolu, kyseliny askorbové a fenylefrinu. Podmínky byly vybírány na základě znalostí fyzikálně chemických vlastností analytů a informací získaných z předchozích prací publikovaných v odborné literatuře (viz 2.4).

Pro separaci byla zvolena metoda RP-HPLC, kolona Macherey-Nagel s náplní NUCLEOSIL C18 o délce 150 mm s vnitřním průměrem 4 mm a velikostí zrn 5 μm . Tato nepolární stacionární fáze se při analýze osvědčila, nebylo proto nutné testovat další sorbenty.

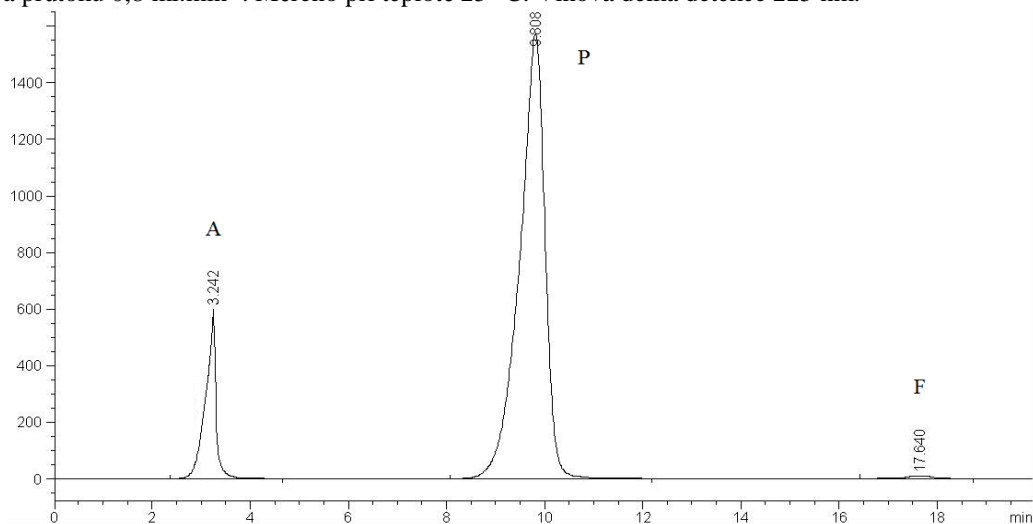
Vzorky byly připravovány rozpouštěním v methanolu. Byla zkoušena také příprava vodných roztoků vzorků či rozpouštění analytů ve směsi methanolu a vody, změna rozpouštědla ale nevedla ke zlepšení výsledků analýzy, v některých případech dokonce výsledky naopak zhoršila (docházelo zde k mírné deformaci píků). Nastříkovan byl objem 10 μl .

Výběr mobilní fáze se odvíjel od vlastností sorbentu, testovány byly směsi složené z polárního organického rozpouštědla (acetonitril nebo methanol) a vody, dále směsi organického rozpouštědla a tlumivého roztoku (octan amonný, dihydrogenfosforečnan draselný). U testovaných směsí se zkoušelo měnit poměry vody a organické fáze, hodnoty pH, koncentrace pufrů a teplotu měření. Nejlepší výsledky poskytovala směs 0,001M vodného roztoku K_2HPO_4 a methanolu v poměru 80 : 20, okyselená 50% H_3PO_4 na pH 3,00. Měření probíhalo při teplotě 25 $^{\circ}\text{C}$ a rychlost průtoku MP byla nastavena na 0,7 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Eluce všech analytů proběhla do 14 minut. Zvýšení teploty na 40 $^{\circ}\text{C}$ se neosvědčilo, docházelo k deformaci píků.

Rychlost průtoku mobilní fáze byla prozkoušena od 0,5 do 1,4 ml.min⁻¹ a hodnota 0,7 ml.min⁻¹ byla zvolena tak, aby byla separace látek dostatečná a doba analýzy co nejkratší. Při zvyšování průtokové rychlosti (v rámci rozmezí daného odolností kolony vůči tlaku, max. 200 bar) se sice zkracovala doba analýzy a při průtokové rychlosti 0,8 ml.min⁻¹ byly píky analytů stále dostatečně separovány, ale docházelo k příliš brzké eluci kyseliny askorbové ($t_R \leq 2$ min), jejíž retenční čas by se tak neodlišil od mrtvého retenčního času kolony. Snížení rychlosti průtoku na méně než 0,5 ml.min⁻¹ není vhodné kvůli příliš velkému prodloužení doby analýzy (> 20 min).



Obr. 6: Chromatogram získaný analýzou směsi standardů PAF při použití vybrané mobilní fáze (směs 0,001M roztoku K_2HPO_4 a methanolu v poměru 80 : 20, okyselená 50% H_3PO_4 na pH 3,00) a průtoku 0,8 ml.min⁻¹. Měřeno při teplotě 25 °C. Vlnová délka detekce 225 nm.



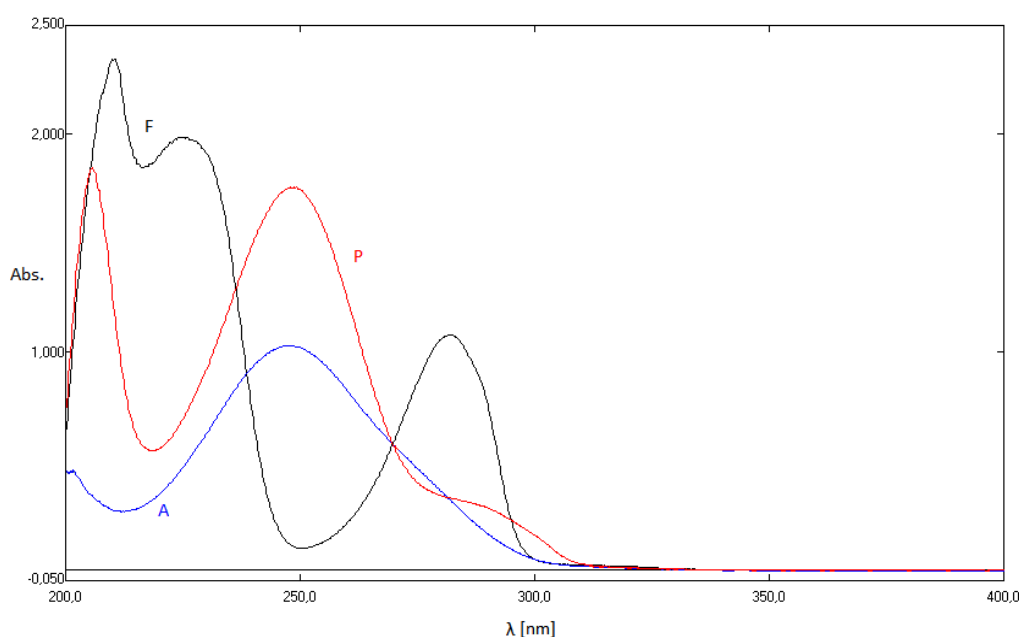
Obr. 7: Chromatogram získaný analýzou roztoku LP₁ při použití vybrané MP (směs 0,001M roztoku K_2HPO_4 a methanolu v poměru 80 : 20, okyselená 50% H_3PO_4 na pH 3,00) a průtoku 0,5 ml.min⁻¹ a teplotě 25 °C. Vlnová délka detekce 225 nm.

Součástí chromatografického systému byl spektrofotometrický detektor s nastavitelnou vlnovou délkou pro detekci. Zpočátku byly testovány vlnové délky pro detekci léčiv běžně používané – 254 nm, 315 nm, 210 nm (zvolené na základě informací z předchozích prací). Žádná se nezdála být pro analýzu optimální. Bylo tedy nutné nastavit takovou vlnovou délku, která umožní simultánní detekci i kvantifikaci analytů také s ohledem na poměr jejich množství v hodnoceném LP. Pro tento účel byla proměřena absorpční spektra látek a na základě informací získaných ze spektrofotometru byla vybrána hodnota 270 nm (průsečík absorpčních spekter paracetamolu, kyseliny askorbové a fenylefrinu). Při této vlnové délce však odezva detektoru pro fenylefrin nebyla dostatečná, proto se přistoupilo k volbě vlnové délky maxima absorpce fenylefrinu – 225nm.

Proměření absorpčních spekter na spektrofotometru v rozmezí vlnové délky (λ) 200 - 400 nm; interval měření absorbance (Abs.) 0,2 nm.

Maxima absorpce P			Maxima absorpce A			Maxima absorpce F		
č.	$\lambda(\text{nm})$	Abs.	č.	$\lambda(\text{nm})$	Abs.	č.	$\lambda(\text{nm})$	Abs.
1	354,00	-0,0086	1	367,80	-0,0030	1	353,60	-0,0016
2	248,60	-0,9190	2	343,80	-0,0017	2	344,20	-0,0010
3	203,60	1,3087	3	248,40	1,0291	3	281,80	1,0792
						4	225,80	1,9862
						5	210,40	2,3470

Obr. 8: Tabulka naměřených hodnot absorbance a vlnové délky maxim.



Obr. 9: Absorpční spektrum paracetamolu (červená), kyseliny askorbové (modrá) a fenylefrinu (černá).

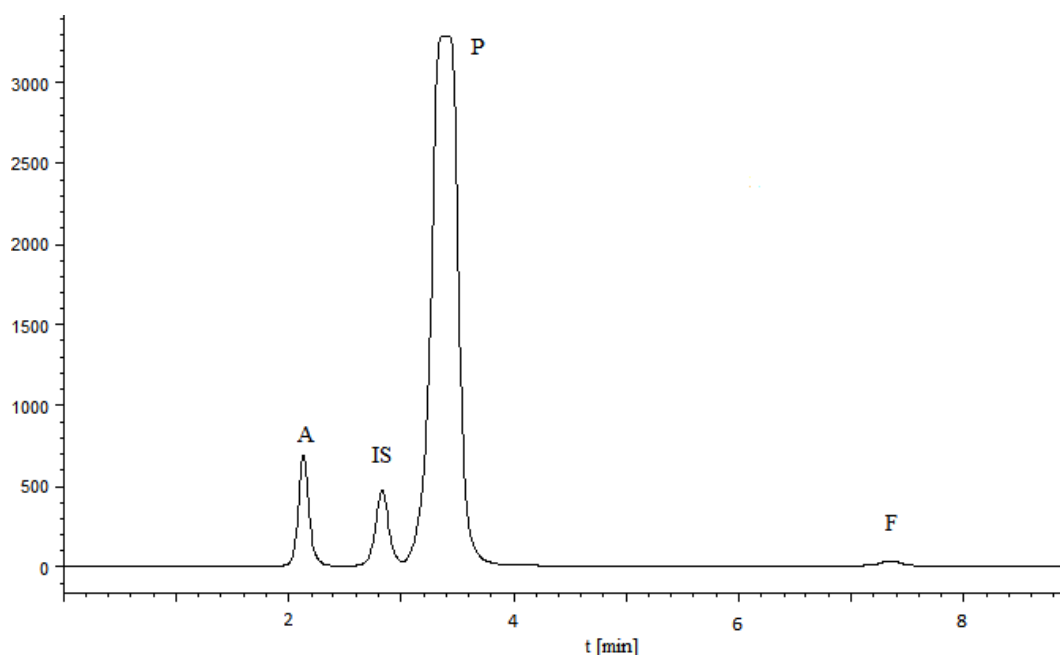
Dalším krokem bylo prozkoumání vlivu změn ve složení nalezené mobilní fáze (směs 0,001M roztoku K_2HPO_4 a methanolu v poměru 80 : 20, okyselená 50% H_3PO_4 na pH 3,00) na výsledky analýzy.

Vliv změn pH mobilní fáze.

Při zvyšování pH (3,67; 4,01; 4,88; 5,80) docházelo ke zhoršení separace hlavně kyseliny askorbové a fenylefrinu. Snižování pH nebylo testováno vzhledem k omezené stabilitě stacionární fáze v kyselém prostředí. Nejvhodnější je okyselit MP tak, aby se její pH co nejvíce blížilo hodnotě 3,00.

Vliv změn poměru organického rozpouštědla a pufru v mobilní fázi.

Při zvyšování podílu organické fáze se snižovala účinnost separace látek, optimální poměr roztoku dihydrogenfosforečnanu draselného a methanolu je 80 : 20 (V/V).



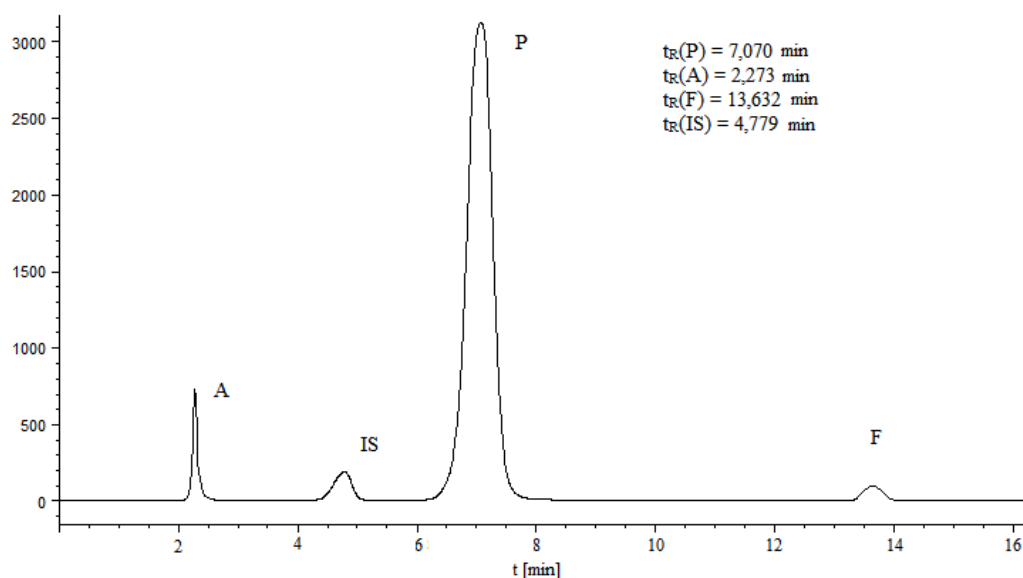
Obr. 10: Chromatogram získaný analýzou směsi PAF s IS ($c_p = 3 \text{ mg.ml}^{-1}$; $c_A = 0,2 \text{ mg.ml}^{-1}$; $c_F = 0,05 \text{ mg.ml}^{-1}$; $c_{IS} = 0,1 \text{ mg.ml}^{-1}$). Nástřik 10 μl , průtok 0,7 ml.min^{-1} , vlnová délka 225 nm. MP 0,001M roztok K_2HPO_4 : methanol = 60 : 40, okyseleno 50% H_3PO_4 na pH 3,00.

Vliv změn koncentrace pufru.

Byly připraveny a testovány mobilní fáze s koncentrovanějším tlumivým roztokem KH_2PO_4 (0,005M; 0,01M; 0,05M), při analýze se však neosvědčily. (Změny pořadí eluce analytů – podobné retenční časy analytů – nedostatečné oddělení píků.)

5.2 PODMÍNKY PRO STANOVENÍ OBSAHU

Pro stanovení obsahu látek v LP bylo nutné kromě nalezení akceptovatelných chromatografických podmínek také vybrat vhodný vnitřní standard. Z třinácti testovaných léčiv zvolených na základě jejich podobných vlastností s paracetamolem, kyselinou askorbovou a fenylefrinem vyhovoval jako vnitřní standard pouze allopurinol. Retenční časy ostatních testovaných léčiv se buďto kryly s retenčními časy analytů nebo se látky eluovaly příliš brzy nebo naopak za příliš dlouhou dobu a jejich použití by tak znamenalo zbytečné prodloužení doby analýzy.



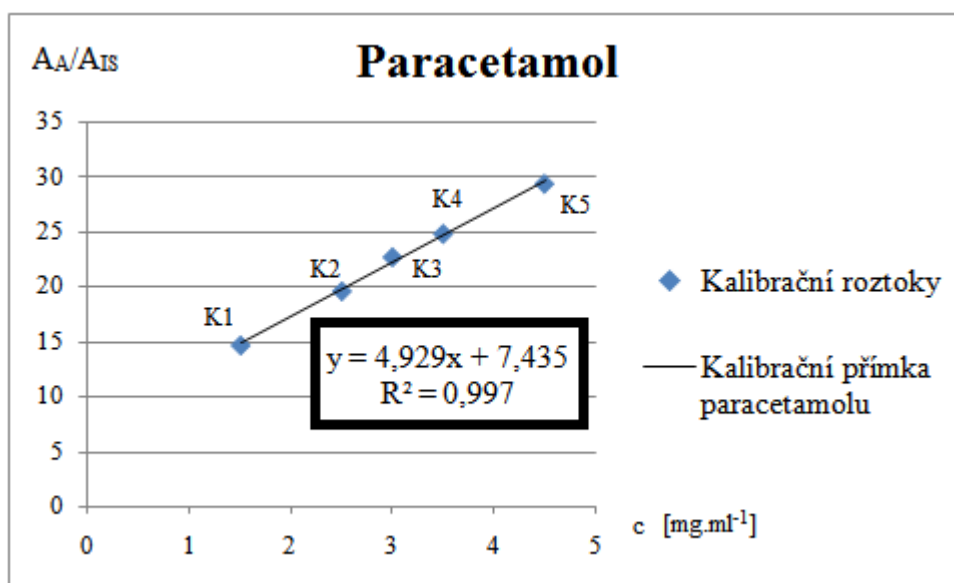
Obr. 11: Chromatogram získaný analýzou směsi standardů paracetamolu ($c = 3 \text{ mg.ml}^{-1}$), kyseliny askorbové ($c = 0,2 \text{ mg.ml}^{-1}$) a fenylefrinu ($c = 0,05 \text{ mg.ml}^{-1}$) s vnitřním standardem allopurinolem ($c = 0,1 \text{ mg.ml}^{-1}$).

MP: směs 0,001M roztoku K_2HPO_4 a methanolu v poměru 80 : 20, okyselená 50% H_3PO_4 na pH 3,00. Vlnová délka detekce 225 nm. Průtoková rychlost 0,7 ml.min^{-1} . Teplota 25 °C.

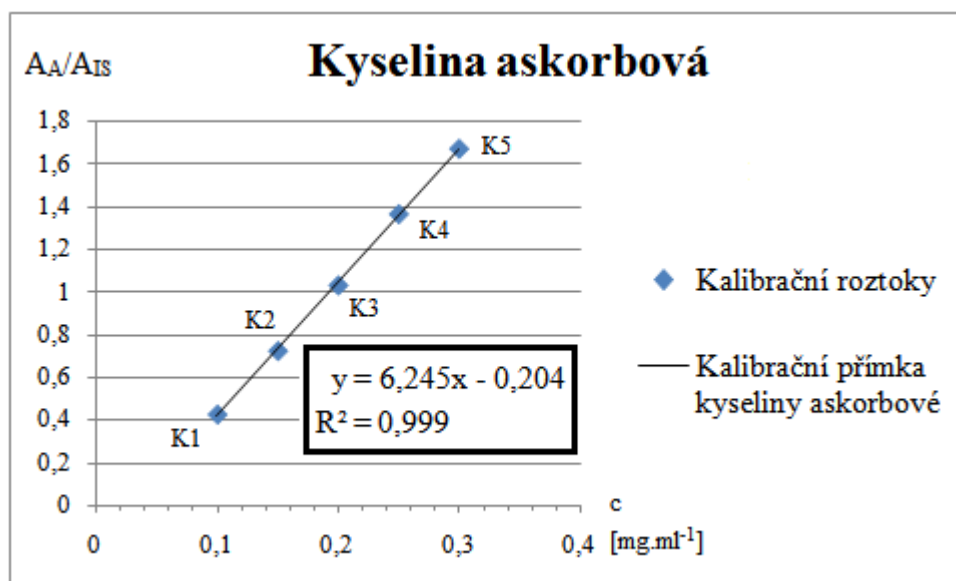
Zvolený vnitřní standard by následně využít při přípravě kalibračních roztoků a vypracování kalibračních závislostí pro jednotlivé analyty. Závislost odezvy detektoru na koncentraci analytu byla lineární pro všechny tři obsahové látky přípravku, grafem byly přímky, jejichž směrnice byly vypočítány a byly tak připraveny podmínky pro stanovení obsahu účinných látek v zadaném LP.

Roztok	Paracetamol		Kys. askorbová		Fenylefrin	
	c [mg.ml ⁻¹]	A _p /A _{IS}	c [mg.ml ⁻¹]	A _A /A _{IS}	c [mg.ml ⁻¹]	A _F /A _{IS}
K1	1,5	14,6687	0,1	0,4287	0,025	0,0623
K2	2,5	19,589	0,15	0,7255	0,035	0,1238
K3	3	22,6925	0,2	1,0325	0,05	0,173
K4	3,5	24,8092	0,25	1,3649	0,065	0,2257
K5	4,5	29,3601	0,3	1,6703	0,075	0,2715

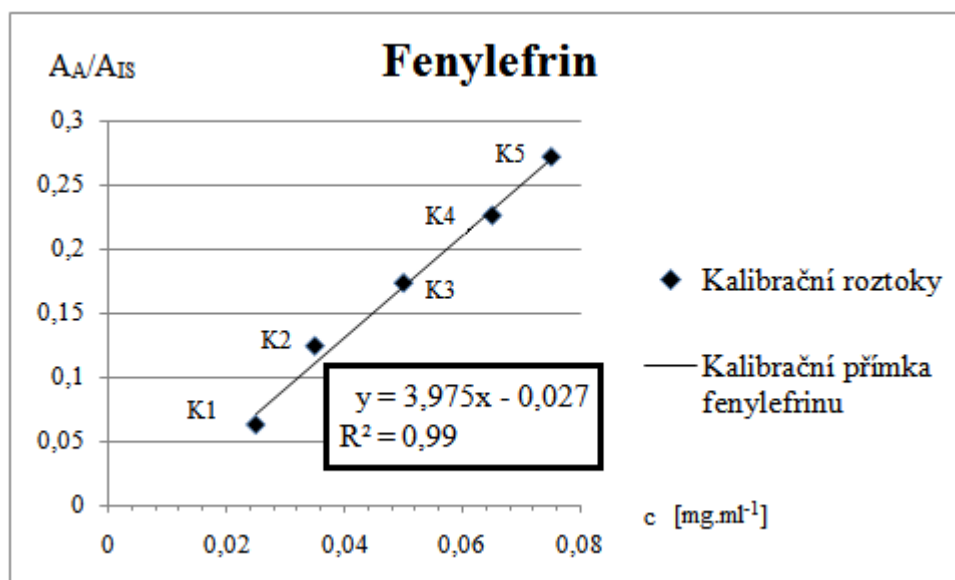
Obr. 12: Kalibrační roztoky – tabulka hodnot (koncentrace látek a vypočtené poměry ploch píků standardů k plochám píků IS)



Obr. 13: Kalibrační závislost paracetamolu



Obr. 14: Kalibrační závislost kyseliny askorbové



Obr. 15: Kalibrační závislost fenylefrinu

6 ZÁVĚR

V diplomové práci byly nalezeny podmínky pro simultánní HPLC analýzu účinných látek práškového léčivého přípravku – paracetamolu, kyseliny askorbové a fenylefrinu v poměru 60 : 4 : 1. Separace probíhala na koloně Macherey-Nagel (náplň NUCLEOSIL C18; délka 150 mm; 4 mm id; velikost zrn 5 μ m). Po vyzkoušení několika možností byla vybrána mobilní fáze – směs 0,001M roztoku K_2HPO_4 a methanolu v poměru 80 : 20, okyselená 50% H_3PO_4 na pH 3,00. Měření probíhalo při teplotě 25 °C. Byl použit spektrofotometrický detektor s nastavitelnou vlnovou délkou detekce, jehož odezva byla optimální při 225 nm. Při průtokové rychlosti 0,7 ml.min⁻¹ trvala analýza 14 min.

Za uvedených podmínek docházelo k dostatečné separaci látek. Na chromatogramech byly patrné píky oddělené až na základní linii, jejichž plocha byla stanovitelná. Byl prozkoumán vliv změn ve složení mobilní fáze na výsledky analýzy. Byl také nalezen vhodný vnitřní standard (allopurinol), vypracovány kalibrační závislosti pro analyty a tím připraveny podmínky pro stanovení obsahu látek v léčivém přípravku.

7 SEZNAM ZKRATEK

A	Kyselina askorbová
AMK	Aminokyseliny
ATC	Anatomicko-terapeuticko-chemická klasifikace léčiv (<i>Anatomical Therapeutic Chemical classification system</i>)
CAD	<i>Charged Aerosol Detector</i>
CNS	Centrální nervový systém
COX ₁	Cyklooxygenáza 1
COX ₂	Cyklooxygenáza 2
CRL	Chemická referenční látka
DAD	Detektor diodového pole (<i>Diode Array Detector</i>)
ELSD	<i>Evaporative Light Scattering Detector</i>
F	Fenylefrin
GC	Plynová chromatografie (<i>Gas Chromatography</i>)
GIT	Gastro-intestinální trakt
GLC	Plynová rozdělovací chromatografie (<i>Gas – Liquid Chromatography</i>)
GPC	Gelová permeační chromatografie (<i>Gel Permeation Chromatography</i>)
GSC	Plynová adsorpční chromatografie (<i>Gas – Solid Chromatography</i>)
HIC	Hydrofobní interakční chromatografie (<i>Hydrophobic Interaction Chromatography</i>)
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
HILIC	Chromatografie hydrofilních interakcí (<i>Hydrophilic Interaction LIquid Chromatography</i>)
id	Vnitřní průměr (<i>Inner Diameter</i>)
IEC	Iontově výměnná chromatografie (<i>Ion Exchange Chromatography</i>)
INN	Mezinárodní nechráněný název (<i>International Non-propriety Name</i>)
IS	Vnitřní standard (<i>Internal Standard</i>)
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>

LC	Kapalinová chromatografie (<i>Liquid Chromatography</i>)
LC-MS	Spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (<i>Liquid Chromatography – Mass Spectrometry</i>)
LF	Léková forma
LLC	Kapalinová rozdělovací chromatografie (<i>Liquid – Liquid Chromatography</i>)
LOD	Limit detekce (<i>Limit Of Detection</i>)
LOQ	Limit kvantifikace (<i>Limit Of Quantification</i>)
LP	Léčivý přípravek
LSC	Kapalinová adsorpční chromatografie (<i>Liquid Solid Chromatography</i>)
MAO	Monoaminoxidáza
MeOH	Methanol
MP	Mobilní fáze (<i>Mobile Phase</i>)
M _r	Relativní molekulová hmotnost (<i>Relative Molecular Mass</i>)
NAPQI	N-acetyl-p-benzochinon-imin
NP	Normální fáze (<i>Normal Phase</i>)
NP-HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie na normálních fázích (<i>Normal Phase High Performance Liquid Chromatography</i>)
NSAIDs	Nesteroidní antiflogistika (<i>Non-Steroid Anti-Inflammatory Drugs</i>)
P	Paracetamol
PC	Papírová chromatografie (<i>Paper Chromatography</i>)
PDA	<i>Photo Diode Array</i>
RID	Refraktometrický detektor (<i>Refractive Index Detector</i>)
RP	Reverzní fáze (<i>Reversed Phase</i>)
RP-HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzních fázích
SAX	Silné měniče aniontů (<i>Strong Anion exchangers</i>)
SCX	Silné měniče kationtů (<i>Strong Cation exchangers</i>)
SEC	Molekulová vylučovací chromatografie (<i>Size Exclusion Chromatography</i>)
SFC	Superkritická fluidní chromatografie (<i>Supercritical Fluid Chromatography</i>)

TLC	Tenkovrstvá chromatografie (<i>Thin Layer Chromatography</i>)
TDM	Terapeutické monitorování hladin léků (<i>Therapeutic Drug Monitoring</i>)
UHPLC	Ultra vysokotlaká kapalinová chromatografie (<i>Ultra-High Pressure Liquid Chromatography</i>)
UPLC	Extrémně účinná kapalinová chromatografie (<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i>)
USAN	<i>United States Adopted Name</i>
WAX	Slabé měniče aniontů (<i>Weak Anion exchangers</i>)
WCX	Slabé měniče kationtů (<i>Weak Cation exchangers</i>)
Z _{P/A/F}	Zásobní roztok paracetamolu/kys. askorbové/fenylefrinu
Z _{KA}	Zásobní roztok kys. askorbové pro kalibraci

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- 1. Suchopár, J. a kol.** *Volně prodejné přípravky, 3.vydání.* Edukafarm, spol. s r.o. **2011.** ISBN 978-80-254-9212-3.
- 2. GlaxoSmithKline Consumer Healthcare, GlaxoSmithKline Export Ltd.** *Souhrn údajů o přípravku COLDREX JUNIOR CITRON.* Brentford, Velká Británie: **2008.** (Poslední revize textu 2010.) SPC 07/429/08-C. [Online databáze] Staženo 10.10.2013 z databáze LP SÚKL. www.sukl.cz
- 3. Churáček, J. a kol.** *Nové trendy v teorii a instrumentaci vybraných analytických metod.* **1993.** Praha: Academia. ISBN 80-200-0010-0.
- 4. Klouda, P.** *Moderní analytické metody.* **1996.** Ostrava: Pavel Klouda. ISBN 80-902155-0-5.
- 5. Karlíček, R. a kol.** *Analytická chemie pro farmaceuty.* **2005.** Praha: Karolinum. ISBN 80-246-0348-9.
- 6. Nováková, L.; Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Katedra analytické chemie.** *POKROKY V HPLC a další vybrané kapitoly....* **2012.** Hradec Králové: Studijní materiály. [Online] Soubor „2012-10-SMIA-POKROKY-HPLC.pdf“ stažen 10.10.2013 ze stránek fakulty. <https://docs.faf.cuni.cz/>
- 7. Klimeš, J. a kol.** *Kontrolně-analytické hodnocení léčiv lékopisnými metodami.* **2011.** Hradec Králové: RNDr. František Skopec, CSc. Nucleus HK. ISBN 978-80-87009-29-1.
- 8. Sýkora, D. – Tesařová, E. – Vosmanská, M. – Zvolánková, M. (2007)** *Moderní stacionární fáze pro RP-HPLC. Chemické Listy;* 101, 190-199. ISSN 1213-7103. [Online verze 10.10.2013] http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2007_03_190-199.pdf
- 9. Nováková, L. – Douša, M.** *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I. 1. vydání.* **2013.** Praha. Hradec Králové: Lucie Nováková, Klatovy: Michal Douša. ISBN 978-80-260-4243-3.

- 10. Karlíček, R.; Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Katedra analytické chemie.** *HPLC – High Performance Liquid Chromatography = Vysokoúčinná kapalinová chromatografie*. **2010**. Hradec Králové: Studijní materiály. [Online] Soubor „*HPLC-II.pdf*“ stažen 08.10.2013 ze stránek fakulty. <https://docs.faf.cuni.cz>
- 11. Šebela, M.; Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Katedra biochemie.** *Chromatografické metody v biochemii*. **2001**. Materiály k výuce. [Online] Prezentace stažena 14.10.2013. <http://biochemie.upol.cz/index.php/cs/studium/materialy-k-vyuce/item/402>.
- 12. Douša, M.** *Internetové stránky HPLC.cz, 1999-2013*. Michal Douša. [Online 02.12.2013] www.hplc.cz
- 13. Kovaříková, P. – Stariat, J.; Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv.** *HPLC - Stacionární fáze a separační módy. Využití vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve farmaceutické analýze*. **2013**. [Online kurz] Staženo z výukového systému Moodle 02.12.2013.
- 14. Solich, P.; Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Katedra analytické chemie.** *Pokroky v kapalinové chromatografii*. **2012**. Hradec Králové: Studijní materiály. [Online] Soubor „*Pokroky-v-HPLC.pdf*“ stažen 08.10.2013 ze stránek fakulty. <https://docs.faf.cuni.cz>
- 15. WikiSkripta.** (Projekt sítě lékařských fakult MEFANET.) ISSN 1804-6517. [Online 14.10.2013] <http://www.wikiskripta.eu/index.php/Chromatografie>
- 16. WATEK, s.r.o.** Technologie a metody pro přípravu ultračisté vody. *Internetové stránky WATEK s.r.o., 1993 – 2009*. Ledec nad Sázavou. [Online 02.12.2013] <http://www.watek.cz/info/technologie>
- 17. Švec, F. (2009)** Co dnes hýbe kapalinovou chromatografií? *Chemické Listy*; 103, 266-270. ISSN 1213-7103. [Online verze 14.10.2013] http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2009_04_266-270.pdf
- 18. Kovaříková, P. – Stariat, J.; Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv.** *HPLC – Popis základního hardwaru. Využití vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve farmaceutické analýze*. **2013**. [Online kurz] Staženo z výukového systému Moodle 02.12.2013.

- 19. Mokřý, M.; Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie. 2012.** Hradec Králové: Studijní materiály. [Online] Soubor „HPLC-_monit.ppt“ stažen 08.10.2013 ze stránek fakulty. <https://docs.faf.cuni.cz>
- 20. Kovaříková, P. – Stariat, J.; Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv. Detektory. Využití vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve farmaceutické analýze. 2013.** [Online kurz] Staženo z výukového systému Moodle 02.12.2013.
- 21. Kovaříková, P. – Stariat, J.; Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv. Spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie. Využití vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve farmaceutické analýze. 2013.** [Online kurz] Staženo z výukového systému Moodle 02.12.2013.
- 22. Český lékopis 2009.** [elektronická verze CD]. Praha: Grada Publishing, **2012.**
- 23. Kovaříková, P. – Stariat, J.; Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv. Kvalitativní a kvantitativní analýza, vývoj analytické metody. Využití vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve farmaceutické analýze. 2013.** [Online kurz] Staženo z výukového systému Moodle 02.12.2013.
- 24. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database.** Compound Summary for CID 6041. Phenylephrine. [Online databáze 20.12.2013] <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=6041>
- 25. Zentiva, k.s. Souhrn údajů o přípravku PARALEN 500 tablety.** Praha: **1978.** (Poslední revize textu 2010.) SPC 07/148/78-C. [Online databáze] Staženo 10.10.2013 z databáze LP SÚKL. www.sukl.cz
- 26. Heinz Lüllman a kol. Farmakologie a toxikologie.** Georg Thieme Verlag: Stuttgart 2003; translation Grada Publishing, a.s., **2004** Praha. ISBN 80-247-0836-1.
- 27. Volf, V. – Votava, F. (2002) Febrilní stavy u dětí. Časopis Remedia; 12,** 24-26. ISSN 0862-8947. [Online verze 14.10.2013] <http://www.remédia.cz/Archiv-rocniku/Rocnik-2002/1-2002/Febrilni-stavy-u-deti/e-9k-9r-fd.magarticle.aspx>

- 28. Suchopár, J. a kol.** *Remedia Compendium, čtvrté vydání.* Praha: Panax Co, spol. s r.o., **2009.** ISBN 978-80-902806-4-9.
- 29. Zentiva, k.s.** *Souhrn údajů o přípravku PARALEN 500 čípky.* Praha: **1981.** (Poslední revize textu 2011.) SPC 07/185/81-C. [Online databáze] Staženo 14.12.2013 z databáze LP SÚKL. www.sukl.cz
- 30. Kršiak, M. – Švihovec, J. – Zupanets, I. – Kriška, M. (2009).** Optimální dávkování paracetamolu při léčbě bolesti a horečky. *Praktické lékařství*; 5(4), 171-174. ISSN 1803-5329. [Online verze 14.10.2013]
<http://praktickelekarenstvi.cz/artkey/lek-200905-0001.php?back=%2Fsearch.php%3Fquery%3Dkr%B9iak%20%B9vihovec%26sfrom%3D0%26spage%3D30>
- 31. United States National Library of Medicine. Toxicology Data Network.** *Hazardous Substances Data Bank, 1994-2012.* Record No. 818.
L-Ascorbic Acid CASRN: 50-81-7. Last Review 2010.
[Online databáze 14.3.2013]
<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/f?./temp/~XFt1CK:1>
- 32. URSAPHARM spol. s.r.o.** *Souhrn údajů o přípravku NEOSYNEPHRIN-POS 10% oční kapky, roztok.* Říčany: **2003.** (Poslední revize textu 2012.) SPC 64/283/03-C. [Online databáze] Staženo 14.12.2013 z databáze LP SÚKL. www.sukl.cz
- 33. Novartis s.r.o.** *Souhrn údajů o přípravku VIBROCIL.* Praha: **1992.** (Poslední revize textu 2013.) SPC 69/301/92-C. SPC 69/300/92-C. SPC 69/299/92-C.
[Online databáze] Staženo 14.12.2013 z databáze LP SÚKL. www.sukl.cz
- 34. Teva Czech Industries s.r.o.** *Souhrn údajů o přípravku OPTHALMO-EVERCIL.* Opava-Komárov: **1984.** (Poslední revize textu 2009.) SPC 64/213/84-C. [Online databáze] Staženo 14.12.2013 z databáze LP SÚKL. www.sukl.cz
- 35. Herb-Pharma Czech s.r.o.** *Souhrn údajů o přípravku Vitamin C-Injektapas 7,5 g. Koncentrát pro infuzní roztok.* Praha: **2013.** (Poslední revize textu 2013.) SPC 86/107/13-C. [Online databáze] Staženo 14.12.2013 z databáze LP SÚKL. www.sukl.cz

- 36. BB Pharma, a.s.** *Souhrn údajů o přípravku ACIDUM ASCORBICUM* Biotika. Praha: **1992**. (Poslední revize textu 2009.) *SPC 86/799/92-S/C*. [Online databáze] Staženo 14.12.2013 z databáze LP SÚKL. www.sukl.cz
- 37. Dr.B.Scheffler GmbH.** *Souhrn údajů o přípravku ADDITIVA Vitamin C* *Zitrone šumivé tablety*. Bergisch Gladbach, Německo: **1993**. (Poslední revize textu 2009.) *SPC 86/215/93-C*. [Online databáze] Staženo 14.12.2013 z databáze LP SÚKL. www.sukl.cz
- 38. Gil-Agustí, M. – Capella-Peiró, E. – Monferrer-Pons, L. – García-Alvarez-Coque, M.C. – Esteve-Romero, J. (2001).** Chromatographic analysis of phenethylamine–antihistamine combinations using C8, C18 or cyano columns and micellar sodium dodecyl sulfate–pentanol mixtures. *Analyst*; 126(4), 457-464. [Online 30.04.2014]
<http://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2001/an/b009546j#!divAbstract>
- 39. Gil-Agustí, M. – Monferrer-Pons, L. – García-Alvarez-Coque, M. C. – Esteve-Romero, J. (2001).** Determination of active ingredients in cough–cold preparations by micellar liquid chromatography. *Talanta*; 54(4), 621-630. [Online 30.04.2014]
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914001003150>
- 40. Pirol, O. – Sukuroglu, M. – Ozden, T. (2011).** Simultaneous determination of Paracetamol, Phenylephrine hydrochloride, Oxolamine citrate and Chlorpheniramine maleate by HPLC in pharmaceutical dosage forms. *Journal of chemistry*; 8(3), 1275-1279. [Online 30.04.2014]
<http://www.hindawi.com/journals/jchem/2011/454325/abs/>
- 41. Douša, M. – Gibala, P. (2010).** Fast HPLC Method Using Ion-Pair and Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography for Determination of Phenylephrine in Pharmaceutical Formulations. *Journal of AOAC International*; 93(5), 1436-1442. [Online 30.04.2014]
<http://www.ingentaconnect.com/content/aoac/jaoac/2010/00000093/00000005/art00013#expand/collapse>

42. Koblová, P. – Sklenářová, H. – Brabcová, I. – Solich, P. (2012).

Development and validation of a rapid HPLC method for the determination of ascorbic acid, phenylephrine, paracetamol and caffeine using a monolithic column. *Analytical Methods*; 4(6), 1588-1591. [Online 30.04.2014]
<http://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2012/ay/c2ay05784k#!divAbstract>

43. Sklenářová, H. – Chocholouš, P. – Koblová, P. – Zahálka, L. –

Šatínský, D. – Matysová, L. – Solich, P. (2013). High-resolution monolithic columns – a new tool for effective and quick separation. *Analytical and bioanalytical chemistry*; 405(7), 2255-2263. [Online 30.04.2014]
<http://link.springer.com/article/10.1007/s00216-012-6561-y>

44. Şenyuva, H. – Özden, T. (2002). Simultaneous high-performance liquid chromatographic determination of paracetamol, phenylephrine HCl, and chlorpheniramine maleate in pharmaceutical dosage forms. *Journal of chromatographic science*; 40(2), 97-100. [Online 30.04.2014]
<http://chromsci.oxfordjournals.org/content/40/2/97.short>

45. Gioia, M. G. – Andreatta, P. – Boschetti, S. – Gatti, R. (2008).

Development and validation of a liquid chromatographic method for the determination of ascorbic acid, dehydroascorbic acid and acetaminophen in pharmaceuticals. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*; 48(2), 331-339. [Online 30.04.2014]
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708508000514>

46. Marín, A. – García, E. – García, A. – Barbas, C. (2002). Validation of a HPLC quantification of acetaminophen, phenylephrine and chlorpheniramine in pharmaceutical formulations: capsules and sachets. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*; 29(4), 701-714. [Online 30.04.2014]
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708502001243>

47. Dewani, A. P. – Barik, B. B. – Chipade, V. D. – Bakal, R. L. – Chandewar, A. V. – Kanungo, S. K. (2012). RP-HPLC-DAD method for the determination of phenylephrine, paracetamol, caffeine and chlorpheniramine in bulk and marketed formulation. *Arabian Journal of Chemistry*; 2012. [Online 30.04.2014]
<http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2012.07.010>

- 48. Deconinck, E. – Sacre, P. Y. – Baudewyns, S. – Courselle, P. – De Beer, J. (2011).** A fast ultra high pressure liquid chromatographic method for qualification and quantification of pharmaceutical combination preparations containing paracetamol, acetyl salicylic acid and/or antihistaminics. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*; 56(2), 200-209. [Online 30.04.2014] <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S073170851100272X>
- 49. García, A. – Rupérez, F. J. – Marín, A. – De la Maza, A. – Barbas, C. (2003).** Poly (ethyleneglycol) column for the determination of acetaminophen, phenylephrine and chlorpheniramine in pharmaceutical formulations. *Journal of Chromatography B*; 785(2), 237-243. [Online 30.04.2014] <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1570023202009042>
- 50. Demiralay, E. Ç. – Gümüştas, M. – Canbay, H. (2011).** Validation of method for simultaneous determination of Paracetamol and Phenylephrine in pharmaceutical formulation by reversed phase liquid chromatography. *Pharmacie Globale International Journal of Comprehensive Pharmacy*; 9(6). [Online 30.04.2014] http://www.pharmacie-globale.info/index.php?option=com_d ocman&task=doc_view&gid=164&tmpl=component&format=raw&Itemid=41
- 51. Heydari, R. (2008).** A new HPLC method for the simultaneous determination of Acetaminophen, Phenylephrine, Dextromethorphan and Chlorpheniramine in pharmaceutical formulations. *Analytical letters*; 41(6), 965-976. [Online 30.04.2014] http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00032710801978137#.U2_1iIF_u2E
- 52. Olmo, B. – García, A. – Marín, A. – Barbas, C. (2005).** New approaches with two cyano columns to the separation of acetaminophen, phenylephrine, chlorpheniramine and related compounds. *Journal of Chromatography B*; 817(2), 159-165. [Online 30.04.2014] <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1570023204009948>
- 53. Thomis, R. – Roets, E. – Hoogmartens, J. (1984).** Analysis of tablets containing aspirin, acetaminophen, and ascorbic acid by high-performance liquid chromatography. *Journal of pharmaceutical sciences*; 73(12), 1830-1833. [Online 30.04.2014] <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jps.2600731246/abstract>

- 54. Bastos, C. D. A. – de Oliveira, M. A. (2009).** Quantitative determination of acetaminophen, phenylephrine and carbinoxamine in tablets by high-performance liquid chromatography. *Química Nova*; 32(7), 1951-1955. [Online 30.04.2014]
<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422009000700044>
- 55. Akay, C. – Değim, İ. T. – Sayal, A. – Aydın, A. – ÖZKAN, Y. – Gül, H. (2009).** Rapid and simultaneous determination of acetylsalicylic acid, paracetamol, and their degradation and toxic impurity products by HPLC in pharmaceutical dosage forms. *Turkish Journal of Medical Sciences*; 38(2), 167-173. [Online 30.04.2014]
<http://mistug.tubitak.gov.tr/bdyim/abs.php?dergi=sag&rak=0709-2>
- 56. Šatínský, D. – Neto, I. – Solich, P. – Sklenářová, H. – Conceicao, M. – Montenegro, B. S. M. – Araujo, A. N. (2004).** Sequential injection chromatographic determination of paracetamol, caffeine, and acetylsalicylic acid in pharmaceutical tablets. *Journal of separation science*; 27(7-8), 529-536. [Online 30.04.2014]
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jssc.200301644/abstract>
- 57. Šatínský, D. – Brabcová, I. – Maroušková, A. – Chocholouš, P. – Solich, P. (2013).** Green chromatography separation of analytes of greatly differing properties using a polyethylene glycol stationary phase and a low-toxic water-based mobile phase. *Analytical and bioanalytical chemistry*; 405(18), 6105-6115. [Online 30.04.2014]
<http://link.springer.com/article/10.1007/s00216-013-7003-1>